

**Aus der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Volk)**

**VOLATILE BIOMARKER IN DER AUSATEMLUFT WÄHREND SYSTEMISCHER
INFLAMMATION**

Eine experimentelle *in vivo* Studie an der beatmeten Ratte

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von Michaela Hedwig Schwaiblmair
geboren am 08.02.1994 in München

Für meine Brüder

Datum: 20.11.2019

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter: PD Dr. Tobias Fink

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Entwicklung von SIRS und MODS	8
Abb. 2: Tierexperimenteller MCC-IMS Arbeitsplatz	21
Abb. 3: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Versuchsgruppen	23
Abb. 4: Querschnitt durch eine Multikapillarsäule & Betriebsparameter MCC-OV5	24
Abb. 5: Schematische Darstellung eines Ionenmobilitätsspektrometers (IMS)	25
Abb. 6: Beispiel eines IMS-Einzelspektrums & Betriebsparameter des Bioscout 2011 MCC-IMS	27
Abb. 7: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA	28
Abb. 8: Schematische Darstellung des HovaCal® 4836-VOC	29
Abb. 9: Beispiel eines 3D-Spektrogramms	33
Abb. 10: Signalintensitäten der signifikanten Peaks nach Induktion einer systemischen Inflammation durch Applikation von TNF- α	40
Abb. 11: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) über den Versuchszeitraum von 24h	42
Abb. 12: IL-6- und IL-10-Plasmakonzentrationen nach TNF- α -Gabe	43
Abb. 13: Chromatogramm der HovaCal®-Messung der TNF- α -Lösung	44
Abb. 14: Signalintensitäten von 1-Butanol, 1-Pentanol, 3-Pentanon und p-Cymol nach isolierter Extremitätenperfusion mittels Injektion von TNF- α	45
Abb. 15: Entstehung von 3-Pentanon im BCKA-Metabolismus	56

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: SOFA-Score	11
Tab. 2: Sepsis-Definitionen und qSOFA-Score nach Sepsis-3	12
Tab. 3: Liste der verwendeten Medikamente und Chemikalien	19
Tab. 4: Technische Daten des HovaCal® 4836-VOC	31
Tab. 5: Atemluftprofil der gesunden Sprague-Dawley® Ratte	36
Tab. 6: Blutgasanalyse und Herzzeitvolumen nach TNF- α -Gabe	38
Tab. 7: Atemluftsignale nach TNF- α -Gabe	39

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µmol/l	Mikromol pro Liter
1/K ₀	reduzierte Ionenmobilität
⁶³ Ni	Nickel-63
^{99m} Tc	Technetium-99m
Abb.	Abbildung
ACCP/SCCM	American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine
AL	Atemluft
BCAA	Branched-chain amino acid, verzweigtkettige Aminosäure
BCAT	Branched-chain aminotransferase, verzweigtkettige Aminotransferase
BCKA	Branched-chain keto acid, verzweigtkettige Ketocarbonsäure
BCKD	Branched-chain keto acid dehydrogenase, verzweigtkettige Ketocarbonsäuren-Dehydrogenase
BCKDK	Branched-chain keto acid dehydrogenase kinase, verzweigtkettige Ketocarbonsäuren-Dehydrogenase-Kinase
BE	Base excess
BG5®	Sterofundin® BG-5 Infusionslösung
BGA	Blutgasanalyse
CD14	Cluster of differentiation 14
cm	Zentimeter
cm ² /Vs	Quadratzentimeter pro Volt mal Sekunde
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESICM	European Society of Intensive Care Medicine

et al.	et alii / et aliae
exsp	expiratorisch
FiO ₂	inspiratorische Sauerstofffraktion
g	Gramm
GC-IMS	Gaschromatograph-Ionenmobilitätsspektrometer
h	Stunde
H ⁺	Proton
H ₂ O	chemische Summenformel des Wassermoleküls
HovaCal®	Hot-Vapour-Calibration-Prüfgasgenerator
Hz	Hertz
i.e.	id est
IL	Interleukin
ILP	Isolierte Extremitätenperfusion
IMS	Ionenmobilitätsspektrometer
insp	inspiratorisch
keV	Kiloelektronenvolt
kg	Kilogramm
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
kJ/kg	Kilojoule pro Kilogramm
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MCC	Multi-capillary-column, Multikapillarsäule
MCC-IMS	Multikapillarsäule-Ionenmobilitätsspektrometer
MFC	Massendurchflussregler
mg	Milligramm
mg/dl	Milligramm pro Deziliter
min	Minute
min ⁻¹	pro Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mmHg	Torr, Millimeter Quecksilbersäule
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome

MUT	Methylmalonyl-CoA-Mutase
mV	Millivolt
ng/l	Nanogramm pro Liter
NI/min	Standard Liter pro Minute
NN	No Name
O ₂	Sauerstoff
PaCO ₂	arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck in mmHg
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck in mmHg
PaO ₂ / FiO ₂	Oxygenierungsindex, Horowitz-Index
PCCA	Propionyl-CoA-Carboxylase (α-Kette)
PCCB	Propionyl-CoA-Carboxylase (β-Kette)
pCO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PEEP	Positive Endexpiratory Pressure
PE-Katheter	Polyethylen-Katheter
pg/l	Pikogramm pro Liter
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
ppb	Parts per Billion
ppm	Parts per Million
PPM1K	Protein Phosphatase Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent 1K
ppt	Parts per Trillion
qSOFA	quick Sequential Organ Failure Assessment Score
R	Respirator
RIP	Reaktionsionen-Peak
RT	Retentionszeit
s	Sekunde
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment Score
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TNF-α	Tumornekrosefaktor-Alpha
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
V/cm	Einheit elektrisches Feld

VOC

Volatile Organic Compound

vs.

versus

W

Watt

ZVK

Zentralvenöser Katheter

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	4
2. SUMMARY	5
3. EINLEITUNG	6
3.1. Inflammation	6
3.1.1. Historie der Inflammation.....	7
3.1.2. Pathophysiologie der systemischen Inflammation.....	8
3.1.3. Diagnostik der systemischen Inflammation.....	9
3.2. Ionenmobilität zur Atemluftanalyse.....	12
4. ZIEL DER STUDIE	16
5. MATERIAL UND METHODEN	17
5.1. Tierexperiment	17
5.1.1. Versuchstiere	17
5.1.2. Anästhesie der Versuchstiere	17
5.1.3. Chirurgische Präparation	18
5.1.4. Versuchsaufbau zur Atemluftanalyse	20
5.1.5. Versuchsgruppen	21
5.1.5.1. Kontrollgruppe	21
5.1.5.2. Inflammationsgruppe	22
5.1.6. Versuchsprotokoll	22
5.2. Atemluftmessung mit Ionenmobilitätsspektrometrie	23
5.2.1. Vortrennung des Gasgemisches durch eine Multikapillarsäule	23
5.2.2. Aufbau und Funktion eines Ionenmobilitätsspektrometers	24
5.3. ELISA-Messung zur Zytokinbestimmung	27
5.4. HovaCal®	29
5.5. Patientenmessung	31

5.5.1. Patient	31
5.5.2. Isolierte Extremitätenperfusion mittels TNF- α	32
5.6. Signalauswertung	32
5.7. Software und Statistik	33
6. ERGEBNISSE	35
6.1. Physiologisches Atemluftprofil der Ratte	35
6.2. Inflammation nach Injektion von TNF-α	37
6.2.1. Blutgasanalyse und Herzzeitvolumen	37
6.2.2. Atemluftprofil	38
6.2.3. Überlebenszeit	41
6.2.4. Vitalparameter	41
6.2.5. Zytokinkonzentration	42
6.3. HovaCal®-Messung	43
6.4. Atemluftprofil der Patientin	44
6.5. Zusammenfassung der Ergebnisse	45
7. DISKUSSION	47
7.1. Diskussion von Material und Methoden	47
7.1.1. <i>In vivo</i> -Modell	47
7.1.2. Vortrennung durch Multikapillarsäule-Kopplung	49
7.1.3. Biomarker-Detektion: Ionenmobilitätsspektrometer	51
7.1.4. Isolierte Extremitätenperfusion	52
7.2. Diskussion der Ergebnisse	53
7.2.1. Tiermessung	53
7.2.1.1. Atemluftanalyse	53
7.2.1.2. Zytokinbestimmung	57
7.2.2. HovaCal®-Messung	58
7.2.3. Patientenmessung	59
7.2.4. Limitationen der Studie	60
7.3. Schlussfolgerung und klinische Perspektiven	61
8. LITERATURVERZEICHNIS	63

9. DANKSAGUNG	82
10. PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE	83
10.1. Abstracts und Kongressbeiträge aus der vorliegenden Arbeit	83
10.2. Weitere Originalarbeiten, Abstracts und Kongressbeiträge	83
11. LEBENSLAUF	85

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die rasche Diagnose einer systemischen Entzündungsreaktion stellt eine wichtige Herausforderung im klinischen Alltag dar. Im Gegensatz zu aktuell verwendeten, relativ unspezifischen Laborparametern könnte die Atemluftanalyse einen vielversprechenden Ansatz zur Frühdetektion einer Inflammation bieten. Im Rahmen dieser Methode wird die exhalierete Luftprobe mittels Ionenmobilitätsspektrometer (IMS) auf bestimmte Komponenten untersucht und auf eine Systemreaktionen des Körpers geschlossen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb mithilfe dieser Technik untersucht, ob während einer systemischen Inflammation volatile Biomarker in der Ausatemluft reproduzierbar zu demonstrieren sind.

Dazu wurden männliche Sprague-Dawley® Ratten über einen Zeitraum von 24 h kontrolliert beatmet und repetitiv abgenommene Atemluftproben mithilfe eines IMS analysiert. Nach Untersuchung des physiologischen Atemluftprofils erfolgte der Vergleich mit dem Atemluftprofil von Tieren, bei denen eine systemische Entzündung induziert wurde. Zu diesem Zweck wurden den beatmeten Ratten eine Dosis von 200 µg/kgKG bzw. 600 µg/kgKG des pro-inflammatorischen Zytokins TNF-α injiziert. Nach der Gabe konnte eine systemische Inflammation nachgewiesen werden. In der Atemluft dieser beiden Gruppen wurde ein signifikanter Anstieg der vier Biomarker 1-Butanol, 1-Pentanol, 3-Pentanone und p-Cymol im Vergleich zum physiologischen Atemluftprofil nachgewiesen. In einem ersten Pilotexperiment konnten diese Veränderungen in einem humanen Patienten nachvollzogen werden, dem mittels isolierter Extremitätenperfusion TNF-α appliziert wurde.

Basierend auf diesen Ergebnissen konnte in der vorliegenden Grundlagenstudie gezeigt werden, dass die Atemluftanalyse mittels IMS zum Nachweis einer systemischen Inflammation einsetzbar ist. Die vorliegende Arbeit demonstrierte darüber hinaus, dass die Anwendung dieser Methode nicht nur auf das Tiermodell beschränkt ist, sondern auch bei der humanen Nutzung vielversprechend sein könnte.

2. SUMMARY

Timely diagnosis of systemic inflammatory reactions is critical in everyday clinical practice. In contrast to currently used unspecific laboratory parameters, breath analysis may represent a promising approach for the early detection of systemic inflammation. This method assesses the exhaled air for specific volatile organic components using ion mobility spectrometers (IMS). The organic components may themselves be associated with systemic inflammation. The present study analyzes whether volatile biomarkers can be reliably detected during systemic inflammation.

Sprague-Dawley® rats were ventilated in a controlled manner over a 24-hour period and breath samples were analyzed by means of an IMS. The physiological profile of the exhaled air from rats was determined and compared with samples of rats during systemic inflammation. Inflammation in rats was induced by injecting a dose of 200 µg/kg or 600 µg/kg of the pro-inflammatory cytokine TNF-α at the beginning of the experiments. After TNF-α-application a systemic inflammation was demonstrated. A significant increase of the biomarkers 1-butanol, 1-pentanol, 3-pentanone, and p-cymol was detected in the exhaled air of animals injected with TNF-α when compared to the profile of exhaled air of non-treated rats. In a first pilot experiment, these four biomarkers were also found to be present in a patient who underwent isolated limb perfusion with TNF-α.

Based on these results, the present proof-of-principle study showed that breath analysis using IMS may be eligible for the detection of systemic inflammation. In addition, the present study demonstrated that the application of this method may not only be limited to an animal model but may also be promising for use in human patients.

3. EINLEITUNG

3.1. Inflammation

Eine Inflammation ist die Antwort eines Organismus auf Schäden, die Gewebe und seine Zellen durch schädliche Chemikalien, physikalische Insulte sowie durch mikrobielle Krankheitserreger erfahren.

Diese Inflamationsreaktion kann zum einen als lokaler Prozess auftreten und ist häufig mit Schmerzen verbunden. Zum anderen kann die Inflammation mit zunehmender Gewebedestruktion eine starke systemische Reaktion des gesamten Körpers auslösen, die als systemische Inflammation (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) zu Multiorganversagen und Tod führen kann [182]. Während die Inflammation sich in einigen Fällen zu einem chronischen Stadium entwickelt, das beispielsweise mit Arthritis, Multipler Sklerose oder Krebsleiden assoziiert ist, verläuft der Inflamationsprozess in anderen Fällen akut [28, 147, 179]. Um dabei einen fatalen Verlauf der Erkrankung abzuwenden, ist die Bedeutung einer raschen Diagnose sowie Intervention prognostisch relevant [81].

Das frühe Erkennen der Inflammation gestaltet sich im klinischen Alltag aufgrund von unspezifischen Primärsymptomen häufig schwierig [41]. Sensible Diagnostikverfahren sind deshalb für einen frühzeitigen Therapiebeginn entscheidend. Ein vielversprechender Ansatz repräsentiert hierbei die Detektion flüchtiger organischer Verbindungen (volatile organic compound, VOC) in der Ausatemluft. Dabei werden abgeatmete Biomarker mit einem geeigneten Detektor analysiert, die präzise Aussagen über quantitative sowie qualitative Veränderungen der Atemluft geben können. Die Anwendung dieser Methode ist bereits zur Detektion von Drogen, Sprengstoffen und zur Diagnostik von pulmonalen Erkrankungen etabliert worden [12, 23, 58, 77]. In der vorliegenden Arbeit soll deshalb anhand eines *in vivo*-Tiermodells die Fragestellung geprüft werden, ob sich die Atemluftanalyse volatiler Biomarker auch zur Diagnostik einer systemischen Inflamationsreaktionen, ausgelöst durch das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α , eignet.

3.1.1. Historie der Inflammation

Bereits vor 2000 Jahren beschrieb Aulus C. Celsus die Kardinalsymptome der Inflammation in seinem Werk *De medicina* mit „*rubor et tumor cum calore et dolore*“ („Röte und Schwellung mit Wärme und Schmerz“) [21, 133, 154]. Die physiologischen Grundlagen dieser Kardinalsymptome erschlossen 1846 August Waller [175, 176] und 1867 Julius Cohnheim [27], denen durch die Entwicklung des Mikroskops neue Einblicke in zelluläre Abläufe ermöglicht wurden. So wurde zum ersten Mal der Austritt von Leukozyten aus Blutgefäßen, die Vasodilatation, sowie die erhöhte Vasopermeabilität als Charakteristika einer Entzündung beschrieben [27, 96, 175, 176]. Durch das Werk Virchows vertiefte sich Anfang des 20. Jahrhunderts das Verständnis über grundlegende inflammatorische Prozesse weiter [121]. So beschrieb er neben der *functio laesa* von entzündetem Gewebe auch die erste Einteilung der Inflamationsreaktionen [172]. Dabei differenzierte er vier verschiedene Inflamations-Typen: die exsudative, die infiltrative, die parenchymatöse sowie die proliferierende Inflammation [171]. Dieses deskriptive Wissen wurde in den darauffolgenden Jahren durch ein vertieftes Verständnis der Zell-Zell-Interaktionen im Rahmen der Immunität, allen voran die Beschreibung der Phagozytose, erweitert [98]. 1910 wurden erstmals Hypothesen über die Rolle von Mediatoren bei der Kommunikation der Entzündungszellen untereinander und mit dem umliegenden Gewebe gestellt, als Dale und Laidlaw Histamin als Hauptbestandteil der anaphylaktischen Reaktion vermuteten [31, 32]. Detailliert beschrieb Lewis den Effekt von Histamin auf Gewebeverletzungen durch seine Triple-Response-Theorie [86]. Darin postulierte er den Effekt von lokalen Mediatoren wie Histamin auf das vaskuläre und das neurogene System, welcher sich klinisch in lokaler Rötung (erste Phase), lokalem Ödem (zweite Phase) und der Ausbreitung des Erythems über histaminempfindlichen Nervenendigungen darstellt (dritte Phase) [60, 86]. Gegenwärtig werden immer weitere Entzündungsmediatoren und ihre Wirkweise identifiziert [99, 108, 119, 168, 173]. Dabei scheint besonders die systemische Inflammation ein komplexes dynamisches Wechselspiel aus zellulären und sekretorischen Komponenten darzustellen.

3.1.2. Pathophysiologie der systemischen Inflammation

Der systemische Inflammationsprozess lässt sich in vier Hauptkomponenten gliedern: den Auslöser, den Sensor, die entzündlichen Mediatoren und das Zielgewebe (*Abbildung 1*).

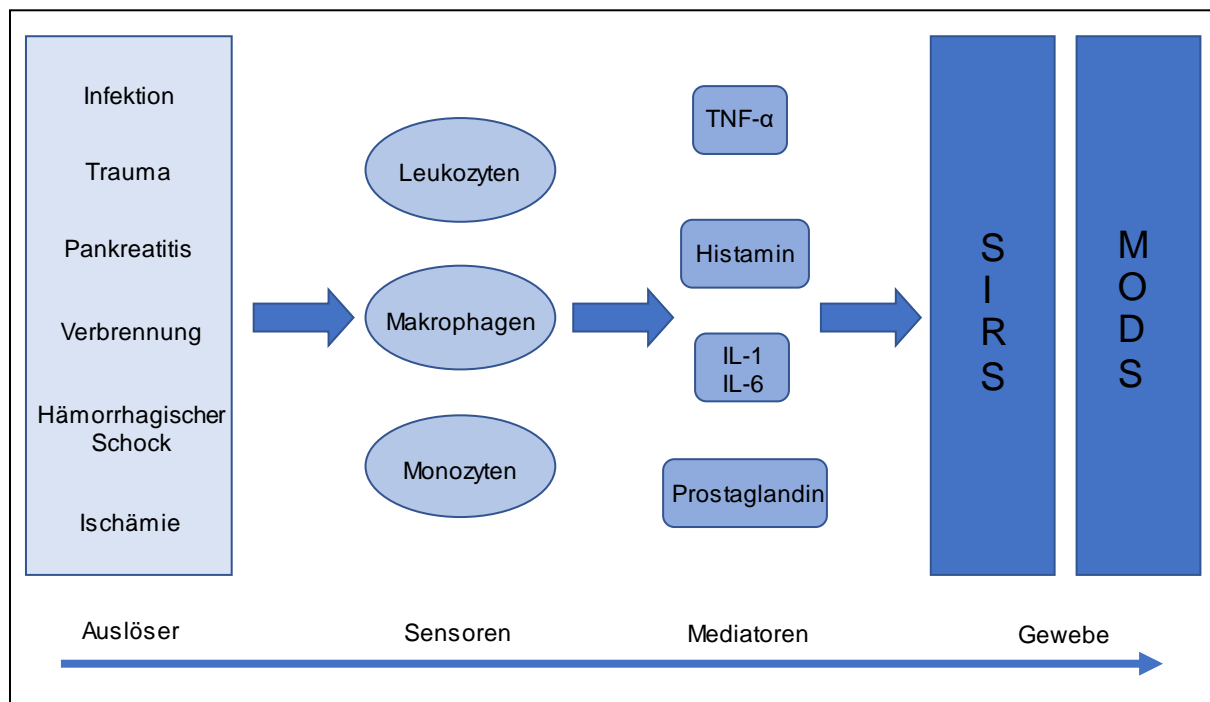


Abbildung 1: **Entwicklung von SIRS und MODS.** TNF-α: Tumornekrosefaktor-α; IL-1: Interleukin-1; IL-6: Interleukin-6; SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome; MODS: Multiple Organ Dysfunction Syndrome. Modifiziert nach [52][103].

Als Auslöser des SIRS kommen neben systemischen oder lokalen Infektionen noch Gewebeischämien unterschiedlicher Genese, der hämorrhagische Schock, immunvermittelte Organverletzung und die exogene Verabreichung von Vermittlern des entzündlichen Prozesses, wie beispielsweise Tumornekrosefaktor, Interleukin-1 und -6, Histamin und Prostaglandine, in Frage [14, 96].

Die zelluläre Immunantwort beginnt mit der Aktivierung und gezielten Migration von Leukozyten (Neutrophile, Eosinophile und Monozyten) und Makrophagen aus dem venösen System zu dem geschädigten Gewebe (*Abbildung 1*). Diese Zellen stellen den Sensor dar, denn diese aktivierten Immunzellen synthetisieren pro-inflammatorische Mediatoren wie Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid und setzen diese daraufhin frei [180]. Für die Auswanderung der neutrophilen Granulozyten zu dem verletzten Gewebe sind mehrere Schritte

verantwortlich [24]. Zuerst werden Adhäsionsmoleküle aktiviert, die das Anheften der Granulozyten an das vaskuläre Endothel erleichtern. Anschließend sorgen aktivierte Integrine für eine zielgerichtete Wanderung zu dem Entzündungsherd, wo Granulozyten dann immobilisiert werden und durch Transmigration durch das Endothel zum Entzündungsherd gelangen [24, 28]. Zeitgleich kann ein biphasischer vaskulärer Prozess beobachtet werden, welcher mit einer initialen, ca. 10-minütigen Vasokonstriktion beginnt und einer Vasodilatation mit gesteigerter Gefäßwandpermeabilität folgt [143]. Nach ihrer Aktivierung setzen Makrophagen und Mastzellen Wachstumsfaktoren und entzündliche Botenstoffe frei, welche endotheliale, epitheliale und mesenchymale Zellen in Proliferation und Differenzierung beeinflussen [28].

Sämtliche Vorgänge werden durch molekularbiologische Regulatoren gesteuert. Zu diesen gehören u.a. chemotaktische Zytokine, die spezifische Leukozytenpopulationen sowie nachgeschaltete Effektorzellen rekrutieren [7, 65, 125]. Ein pro-inflammatorisches Zytokin ist der Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF- α), welcher unter anderem Entzündungszellpopulationen kontrolliert, die blutdrucksenkende NO-Synthetase im Endothel induziert sowie den Plättchenaktivierenden Faktor freisetzt [102, 108, 188]. Weitere Vertreter der Entzündungsmediatoren sind Histamin, Interleukin (IL)-1 und -6, Prostaglandin und Bradykinin [14, 96, 119]. Die Auswirkungen dieser Prozesse auf das entzündete Gewebe können sich in unterschiedlich schweren Krankheitsbildern äußern. Dabei stellt die lokale Inflammationsreaktion meist nicht die größte Komplikation der zugrundeliegenden Erkrankung dar. In einigen Fällen kommt es statt einer Heilung zu einer überschießenden Immunantwort des betroffenen Wirts, bei der die freigesetzten pro-inflammatorischen Mediatoren und Sauerstoffradikale die körpereigenen Zellen zerstören. So kann eine systemische Reaktion über einzelne Organsysteme hinaus zum Multiorganversagen (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) führen, welches mit einer hohen Letalität assoziiert ist [10, 40, 51, 141, 157].

3.1.3. Diagnostik der systemischen Inflammation

Die internationale Konsensus-Konferenz des American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) befasste sich 1991 mit der Suche nach einer leicht anwendbaren vereinheitlichenden Definition zur Früherkennung einer

systemischen Entzündungsreaktion [14]. Aus dieser Arbeit ging eine Definition hervor, nach der eine systemische Entzündungsreaktion bei Erfüllung von mindestens zwei SIRS-Kriterien vorliegt. Zu diesen zählen Fieber ($\geq 38\text{ }^{\circ}\text{C}$), oder Hypothermie ($\leq 36\text{ }^{\circ}\text{C}$), Tachykardie (Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$), Tachypnoe (Frequenz $\geq 20/\text{min}$), Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 4,3\text{ kPa} / \leq 33\text{ mmHg}$), Leukozytose ($\geq 12.000/\text{mm}^3$), oder Leukopenie ($\leq 4000/\text{mm}^3$) und $\geq 10\%$ unreife neutrophile Granulozyten im Differentialblutbild. Wird darüber hinaus noch der mikrobiologische Nachweis einer Infektion erbracht, liegt *per definitionem* von 1991 eine Sepsis vor [1, 14]. Das primäre Ziel der SIRS-Kriterien war, eine zeitnahe Diagnosefindung anhand leicht verfügbarer klinischer Parameter zu ermöglichen, ohne auf anspruchsvolle und mitunter zeitaufwendige Untersuchungen der entzündlichen Biomarker warten zu müssen. Allerdings weisen die SIRS-Kriterien nur eine geringe Spezifität bei hoher Sensitivität auf, weswegen der Erfahrungswert des behandelnden Arztes einen entscheidenden Einfluss auf die korrekte Diagnosestellung innehält [7, 85].

Zur objektiven, quantitativen und qualitativen Beschreibung des Grades an Organdysfunktion bei MODS infolge einer systemischen Inflammation organisierte die European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) 1994 eine Konsensus Konferenz mit dem Ziel, einen adäquaten Score anhand prädefinierter Parameter festzulegen [51, 170]. Dieser Sequential-Organ-Failure-Assessment-Score (SOFA-Score) beurteilt die sechs Entitäten Lungenfunktion, Gerinnung, Leber, Herz-Kreislauf, zentrales Nervensystem sowie Nieren und bewertet diese je nach Funktion von 0 (normale Funktion) bis 4 (stark beeinträchtigte Funktion) (*Tabelle 1*). Der wissenschaftliche Nachweis der Korrelation eines hohen SOFA-Scores mit der Mortalität von intensivmedizinisch betreuten Patienten erbrachte Vincent *et al.* in einer prospektiven Studie an 1449 Patienten [169].

2001 und 2014 erfolgte eine Überarbeitung der Empfehlungen der Konsensus-Konferenz von 1991 [85, 135, 140]. Die Teilnehmer der sog. Sepsis-3-Konferenz von 2014 beurteilten die SIRS-Kriterien der ersten Konsensus-Konferenz im Allgemeinen als stark limitiert, da viele Patienten diese Kriterien aufweisen, ohne jemals eine lebensbedrohliche, inadäquate Wirtsantwort zu entwickeln. Auf der anderen Seite wurde angemerkt, dass einer von acht neu aufgenommenen Intensivpatienten mit Infektion oder Organversagen nicht die nötigen zwei SIRS-Kriterien erfüllt, um als ein Sepsis-Patient eingestuft zu werden [140].

SOFA-Score	1	2	3	4
Lungenfunktion				
PaO ₂ / FiO ₂ , mmHg	< 400	< 300	< 200 -----mit Unterstützung der Atmung-----	< 100
Koagulation				
Thrombozyten x 10 ³ / mm ³	< 150	< 100	< 50	< 20
Leberfunktion				
Bilirubin, mg/dl (µmol/l)	1,2 - 1,9 (20 - 30)	2,0 - 5,9 (33 - 101)	6,0 - 11,9 (102 - 204)	> 12,0 (> 204)
Kreislauffunktion				
Hypotension Dosis in µg/kg/min	MAP < 70 mmHg	Dopamin ≤ 5 oder Dobutamin (beliebige Dosis) für mind. 1 h	Dopamin > 5 oder Epinephrin ≤ 0,1 oder Norepinephrin ≤ 0,1	Dopamin > 15 oder Epinephrin > 0,1 oder Norepinephrin > 0,1
Zentrales Nervensystem				
Glasgow Coma Scale	13 - 14	10 - 12	6 - 9	< 6
Nierenfunktion				
Kreatinin, mg / dl (µmol / l)	1,2 - 1,9 (110 - 170)	2,0 - 3,4 (171 - 299)	3,5 - 4,9 (300 - 440)	> 5 (> 440)
Harnausscheidung			< 500 ml / Tag	< 200 ml / Tag

Tabelle 1: SOFA-Score. Katecholamin-Dosis in µg/kg/min; PaO₂: arterieller Sauerstoffpartialdruck, FiO₂: inspiratorische Sauerstoffkonzentration; PaO₂ / FiO₂: Oxygenierungsindex; MAP: mittlerer arterieller Druck. Modifiziert nach Vincent *et al.* [170].

Die aktuelle Definition beschreibt die systemische Inflammation im Rahmen einer Sepsis als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer inadäquaten Wirtsreaktion auf eine Infektion. Eine Organdysfunktion wird hierbei definiert als ein SOFA-Score von ≥ 2 Punkten als Konsequenz auf die Infektion (*Tabelle 2*). Außerdem wurde ein weiterer Score etabliert, der die Identifikation von Patienten erleichtern soll, bei denen ein verlängerter Intensivaufenthalt und ein höheres Mortalitätsrisiko zu erwarten sind. Zu den Kriterien des Quick-SOFA-Score (qSOFA) gehören Veränderungen des mentalen Zustands, systolischer Blutdruck ≤ 100 mmHg, oder eine Atemfrequenz von ≥ 22 /min.

Ein weiterer Fokus lag bei der Konferenz 2014 auf dem Einfluss der Entzündungsreaktion auf objektiv messbare Biomarker. Änderungen verschiedener Biomarker, darunter Procalcitonin, IL-6, Adrenomedullin, lösliches CD14, lösliches Endothelzell- / Leukozytenadhäsionsmolekül-1, Macrophage Inflammatory Protein (MCP)-1 α , extrazelluläre Phospholipase A₂ sowie C-reaktives Protein sind in Patienten, die die weit gefassten SIRS-Kriterien aus dem Jahr 1991 erfüllen, beschrieben [64, 145, 149, 153, 160]. Klinische Anwendung findet heute vorrangig Procalcitonin [152, 174].

Der Wunsch nach zusätzlichen Parametern, die auf eine Inflammationsreaktion

möglichst zeitnah hinweisen, führte zu der Idee die Ionenmobilitätsspektrometrische Untersuchung der Ausatemluft zum Nachweis einer Inflammation zu untersuchen.

I. Sepsis

- Definiert als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer inadäquaten Wirtsreaktion auf eine Infektion

II. Organdysfunktion

- akute Veränderung des SOFA-Scores auf ≥ 2 Punkte als Konsequenz auf die Infektion
- Die Baseline des SOFA-Scores liegt bei Patienten ohne bekannte Organdysfunktion bei 0
- Ein SOFA-Score ≥ 2 gibt ein Gesamt-Mortalitätsrisiko von 10 % in der allgemeinen Krankenhauspopulation wieder
- Patienten, bei denen ein längerer Intensivaufenthalt und ein höheres Mortalitätsrisiko erwartet wird, können zeitnah mithilfe des qSOFA (Quick SOFA)-Scores ermittelt werden

III. qSOFA (Quick SOFA) Kriterien

- Respirationsrate $\geq 22/\text{min}$
- Veränderungen des mentalen Zustands
- Systolischer Blutdruck $\leq 100 \text{ mmHg}$

IV. Septischer Schock

- Definition: Septischer Schock ist eine Untergruppe der Sepsis, bei dem zugrunde liegende Kreislauf und Zell-/Stoffwechselstörungen gravierend genug sind, um die Mortalität wesentlich zu erhöhen
 - Kriterien: Sepsis + persistierende Hypotension, die Vasopressoren benötigt, um MAP $\geq 65 \text{ mmHg}$ zu halten + Serumlaktat $\geq 2 \text{ mmol/L}$ (18 mg/dl), trotz adäquater Volumensubstitution
-

Tabelle 2: Sepsis-Definitionen und qSOFA-Score nach Sepsis-3. SOFA-Score: Sequential Organ Failure Assessment-Score, qSOFA-Score: Quick SOFA-Score, MAP: mittlerer arterieller Blutdruck. [140]

3.2. Ionenmobilitätsspektrometrie zur Atemluftanalyse

Die Grundlagen für das Prinzip der Ionenmobilitätsspektrometrie setzte der Physiker Paul Langevin im frühen 20. Jahrhundert, als er die Bewegung von Ionen im elektrischen Feld beschrieb [82]. Erst 70 Jahre später wurde dieses chemisch-physikalische Analysegerät unter der Bezeichnung Plasma-Chromatograph eingeführt und seitdem weiterentwickelt, sodass das Ionenmobilitätsspektrometer (IMS) heutzutage eine kostengünstige und aussagekräftige Analysetechnik zur Bestimmung von Gasen in Umgebungsdruck bei Raumtemperatur darstellt [26, 29].

Ursprünglich wurde das IMS vom amerikanischen und britischen Militär zur frühzeitigen Identifikation von feindlichen Kämpfern im vietnamesischen Dschungel entwickelt [38]. Seit den späten 1970er Jahren erkannte auch die zivile Wissenschaft das Potential der Ionenmobilitätsspektrometrie für Forschungszwecke, unter anderem

aufgrund einer niedrigen Nachweisgrenze im unteren ppb_v- bis ppt_v-Bereich (ppb = parts per billion; ppt = parts per trillion, v = bezogen auf das Volumen), der Detektion von Analyten unterschiedlicher chemischer Substanzklassen in Umgebungsdruck und kurzen Analysezeiten von wenigen Minuten. Die Errungenschaft, das IMS-Gerät zum leichteren Transport zu miniaturisieren, hat die Anwendungsmöglichkeiten von Laboren auf den alltäglichen Berufsgebrauch erweitert [29].

Das Prinzip der Ionenmobilitätsspektrometrie beruht auf der Ionisierung, Trennung und Detektion von Analyt-Molekülen. Dabei werden die in einem Trägergas vorliegenden Moleküle zuerst mittels einer geeigneten Strahlenquelle, z.B. UV-Strahlungsquelle oder radioaktive Strahlungsquellen, bei Umgebungsdruck ionisiert und anschließend durch ein sich periodisch öffnendes Gitter in die sogenannte Driftröhre des IMS geleitet. Die Ionen wandern dort entlang der Feldlinien eines homogenen elektronischen Feldes und entgegen der Strömungsrichtung eines Driftgases in Richtung einer Elektrode. Beim Auftreffen auf die Elektrode erzeugen die Ionen ein elektrisches Signal, welches verstärkt und digitalisiert wird. Die Trennung der Ionen gleicher Ladung, aber unterschiedlicher Masse oder Struktur wird durch die Anzahl der Zusammenstöße mit den Driftgasmolekülen bewerkstelligt. Jedes Analyt-Ion benötigt eine definierte mittlere Driftzeit durch die Driftstrecke des IMS und wird so von den anderen Ionen getrennt. Zur Bestimmung der Konzentration wird die Anzahl an Ionen ermittelt, die gleichzeitig bei der Elektrode eintreffen [9, 138, 165].

Um die Spezifität der Analyse zu erhöhen und Proben mit hoher Luftfeuchtigkeit messen zu können, kann das IMS-Gerät mit einer Multikapillarsäule (multicapillary columns, MCC) gekoppelt werden. Dabei werden die Analyt-Moleküle vor dem Eintritt in den Ionisationsraum des IMS durch parallel angeordnete Kapillaren geleitet. Die Durchtrittszeit (Retentionszeit) durch die Kapillaren ist für die einzelnen Analyt-Moleküle charakteristisch [138].

Durch das breite Anwendungsspektrum hat das IMS heutzutage Einzug in verschiedene Anwendungsbereiche gefunden. Hauptaugenmerk der nicht-medizinischen Anwendung der Ionenmobilitätsspektrometrie liegt auf der Erkennung und Klassifikation von chemischen Waffen, Sprengstoffen und Drogen [23, 75, 77, 115, 144]. Allerdings findet das IMS mittlerweile auch in der Sicherung und Überprüfung von Umwelt- und Lebensmittelqualität Einsatz [129, 146, 167].

Durch die Erweiterung des IMS mit einer Multikapillarsäule (MCC-IMS) zur Vortrennung der Atemluft wurde die Forschung und medizinische Anwendung der

Ionenmobilitätsspektrometrie revolutioniert [45]. Die nicht invasive Anwendung ermöglicht den schonenden Einsatz selbst bei schwerkranken Patienten. Ein weiterer positiver Aspekt ist die kleine Größe und der geräuscharme Betrieb des Geräts, welcher die Messung von Raum- und Atemluft direkt am Patientenbett ermöglicht. Als Trägergas ist lediglich synthetische Luft nötig. Buchinger *et al.* verwies bereits auf die prinzipielle Eignung im Operationssaal [17].

Die Ausatemluft besteht aus vielen volatilen Biomarkern, die zu einem großen Teil aus Metaboliten des körpereigenen Stoffwechsels herrühren. Mit diesem Wissen können Veränderungen und Neuauftreten von ebendiesen VOCs auf einen pathologischen Prozess im Patienten hindeuten.

Die IMS-Forschung auf dem Gebiet der Lungenerkrankungen stellt das größte Feld der Atemluftanalyse dar. So wurden bereits Lungenkrebs [8, 34, 58], chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) [12, 36, 181], Asthma bronchiale [106, 163], Infektionen [91, 116], sowie eine Asbestose [19] untersucht. Im Zuge des Japanese National Lung Screening Trial verglich Hadan *et al.* das Atemluftprofil von 61 Lungenkrebspatienten mit 40 gesunden Probanden. Von 105 untersuchten VOCs wiesen 10 davon auf ein vorhandenes Lungenkarzinom hin. Dabei hatte die Substanz n-Dodecan mit einer Sensitivität von 90% und einer Spezifität von 69% den höchsten prädiktiven Wert [58].

Für die Differenzierung von Patienten mit und ohne COPD eignet sich das zyklische Keton Cyclohexanon [12, 181]; auch bei Mäusen mit Asthma bronchiale konnten Biomarker in der bronchoalveolären Lavage detektiert werden, die auf eine Inflammation der Atemwege hinweisen [106, 163].

Bei Patienten, die an einer akuten oder chronischen Niereninsuffizienz leiden, kann man häufig einen charakteristischen, nach Urin riechenden Atem- und Körpergeruch, den *Foeter uraemicus*, feststellen. Aufgrund der Identifizierung von drei VOCs, die bei eingeschränkter Nierenfunktion in der Atemluft akkumulieren und nach Hämodialyse wieder abfallen, könnte es in Zukunft möglich sein, charakteristische Veränderungen des Atemluftprofils zur Früherkennung der Niereninsuffizienz zu nutzen [68, 104, 107].

Eine Vollnarkose kann durch inhalative und intravenöse Anästhetika induziert und aufrechterhalten werden. Die Überwachung der Konzentration mittels Ausatemluftmessung wird heutzutage bereits für die inhalative Anästhesie im klinischen Alltag angewendet. Für die Bestimmung der Konzentration von

intravenösen Anästhetika in der Atemluft, wie z.B. das häufig verwendete Propofol, gibt es noch keine etablierte Messung. Allerdings weisen einige Forschungsprojekte vielversprechende Untersuchungsergebnisse auf [11, 55, 79, 150]. Hornuss und Perl *et al.* bestimmten den Zusammenhang zwischen der Blut-Ausatemluft-Konzentration von Propofol [67, 109]. Diese Ergebnisse bereiten den Weg zu einer verbesserten Steuerung der intravenösen Narkose mittels des Anästhetikums Propofol. Zur Überwachung einer Propofol-Narkose mittels Analyse der Ausatemluft ist mit dem Exhaled Drug Monitor (EDMON, B&S Analytik GmbH, Dortmund, Germany) nun auch das erste kommerzielle Gerät verfügbar.

Eine zeitnahe und akkurate Diagnosestellung mit direkt anschließender Therapie ist bei SIRS / Sepsis für das Überleben der Patienten entscheidend [81]. Guamán *et al.* konnte erstmals flüchtige organische Verbindungen bei systemischer Inflammation 24 h nach Induktion einer Inflammation durch intraperitoneale Lipopolysaccharid-Injektion mithilfe eines Gaschromatograph-IMS (GC-IMS) messen [57]. Aceton sowie 14 weitere VOCs unterschieden sich in dieser Studie bei inflammatorischen und gesunden Versuchstieren. Auch MCC-IMS-Geräte wurden bereits bei der Suche nach signifikanten VOC-Veränderungen in inflammatorischen Ratten verwendet. So fand Fink *et al.* 7 VOCs, die sich bei Ratten nach Lipopolysaccharid-Injektion signifikant von denen einer Kontrollgruppe unterschieden [46].

In Tiermodellen konnte bereits gezeigt werden, dass auch die Anwendung von TNF- α zur zuverlässigen Modellierung der im menschlichen Körper ablaufenden Entzündungsreaktionen führt [13, 122, 136]. In der vorliegenden Arbeit wurden nun die Auswirkungen einer Inflammation nach TNF- α -Injektion auf das Atemluftprofil von beatmeten Ratten untersucht. Dabei sollte herausgefunden werden, ob sich die Atemluftanalyse volatiler Biomarker prinzipiell auch zur Diagnostik von systemischen Inflamationsreaktionen im Körper eignet.

4. ZIEL DER STUDIE

Ziel dieser Studie war es, Veränderungen volatiler Biomarker in der Ausatemluft bei systemischer Inflammation zu analysieren. Um dies zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit das Atemluftprofil von beatmeten Ratten beobachtet, denen zur Induktion einer Inflammation TNF- α in zwei verschiedenen Dosierungen injiziert wurde. Die Ergebnisse der Messungen wurden mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen.

Zudem wurde im Rahmen einer Atemluftanalyse beim Menschen während systemischer Inflammation untersucht, ob die volatilen Biomarker der Tiermessungen ebenso beim Menschen detektierbar sind.

Zusammengefasst wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Gibt es Unterschiede im Atemluftprofil von gesunden Ratten und Ratten nach Induktion einer systemischen Inflammation mit TNF- α ?
2. Sind die Veränderungen des Atemluftprofils der Ratten abhängig von der applizierten TNF- α -Dosis?
3. Ist die Veränderung von volatilen Biomarkern während systemischer Inflammation auch begleitet von Änderungen der Vitalparameter, dem Überleben und von pro-inflammatorischen Zytokinen im Blut?
4. Sind gemessene Atemluftsignale bei Ratten prinzipiell auch im Atemluftprofil eines Menschen während systemischer Inflammation detektierbar?

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. Tierexperiment

5.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten für alle tierexperimentellen Untersuchungen männliche Sprague-Dawley® Ratten (Charles River (WIGA) GmbH, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 200-300 g, welches einem Alter von 8 bis 10 Wochen entspricht. Alle Tierversuche wurden unter Berücksichtigung des deutschen Tierschutzgesetzes (§ 7-9 TierSchG) nach Genehmigung durch die zuständige Tierschutzkommission (Nummer 36/14, Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Saarbrücken, Deutschland) durchgeführt. Die Tiere wurden bis zum Versuchsbeginn unter standardisierten klimatischen Bedingungen (Lufttemperatur $20 \pm 2^\circ\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $50 \pm 5\%$) in der Abteilung für Klinisch-Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. Michael D. Menger) gehalten. Als Nahrung diente Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Deutschland) sowie Wasser *ad libitum*. Um nahrungsabhängige Störeinflüsse zu vermeiden, wurden die Tiere 12 h vor Versuchsbeginn einer Nahrungskarenz unterzogen.

5.1.2. Anästhesie der Versuchstiere

Vor der Präparation wurden die Ratten zuerst durch eine inhalative Kurznarkose mit Sevofluran (Baxter, Deerfield, IL, USA) sediert. Nach dem Wiegen wurden die Ratten anschließend durch gewichtsadaptierte Gabe (60 mg/kgKG) Pentobarbital (Narcoren® 16g/100ml; Merial, Hallbergmoos, Deutschland) intraperitoneal in den linken unteren Quadranten des Abdomens anästhesiert. Die chirurgische Präparation wurde erst begonnen, wenn die Versuchstiere das Stadium einer suffizienten Analgesie bei erhaltener Spontanatmung erreichten und somit von einer ausreichenden Narkosetiefe ausgegangen werden konnte. Sobald ein zentraler Venenkatheter (ZVK) in die rechte *Vena jugularis interna* angelegt wurde, konnte Pentobarbital bedarfsgerecht intravenös verabreicht werden (0,2 ml/30 min einer 16g/100 ml Injektionslösung). Um

eine Hypothermie zu verhindern, wurden die Versuchstiere während des gesamten Experiments auf einer Wärmeplatte (Terra Plus Comfort Heat Mat, Eurozoo e.K., Geilenkirchen, Deutschland) in Rückenlage platziert und die Körpertemperatur über ein rektales Thermometer überprüft.

5.1.3. Chirurgische Präparation

Den Beginn der chirurgischen Präparation stellte die Tracheotomie und nachfolgende Platzierung einer Trachealkanüle aus Edelstahl dar, welche die maschinelle Beatmung nach der Präparation ermöglichte [185]. Hierzu wurde zuerst zwischen *Manubrium sterni* und *Mandibula* ein etwa 1 cm langer Hautschnitt vorgenommen und die freigelegte Faszie mit dem Lokalanästhetikum Bupivacain (actavis Group PTC ehf, Hafnorfjörður, Island) betäubt. Anschließend wurde die *Trachea* stumpf freipräpariert, nach Inzision zwischen zwei Knorpelspangen die Trachealkanüle eingeführt und mit Haltefäden kranial und kaudal der Inzisur fixiert.

Über die rechte *Vena jugularis interna* erfolgte nun die Anlage eines ZVK. Dazu wurde nach stumpfer Freilegung und kranialer Legierung der Vene ein kleiner Schnitt zur Eröffnung des Gefäßes vorgenommen. Anschließend konnte ein Polyethylen-Katheter (PE-50 0,4 x 0,8 mm, Braun, Melsungen, Deutschland) vorgeschoben und mit Haltefäden befestigt werden. Über den ZVK wurde mithilfe eines Perfusors (Fresenius Kabi, Injectomat®; TIVA Agilia, Bad Homburg, Deutschland) die Flüssigkeitssubstitution (0,5 ml/h x kgKG Sterofundin BG5®; B. Braun, Melsungen, Deutschland), die Verabreichung der bedarfsgerechten Narkose (0,2 ml/30 min einer 16 g/100 ml Pentobarbital-Lösung) und die Gabe der Studienmedikation sichergestellt (Tabelle 3).

Zur invasiven Messung von Blutdruck, Pulsfrequenz und Entnahme von Blut zur Analyse der Blutgase, sowie der Messung von Zytokinen, wurde die linke *Arteria femoralis* kanüliert. Um die Arterie freizulegen, wurde in der linken Leiste zuerst ein 1 cm langer Hautschnitt vorgenommen und im Anschluss daran das Bindegewebe stumpf voneinander getrennt. Die Arterie stellt sich zumeist zusammen mit der zugehörigen *Vena femoralis* dar und musste von ebendieser separiert werden. Zur Vermeidung großer Blutverluste wurde eine Bulldog-Klemme im Bereich des Leistenbandes auf die *Arteria femoralis* platziert und die Arterie distal legiert. Danach

wurde das Gefäß mit einer chirurgischen Gefäßschere eröffnet und der Katheter unter mikroskopischer Sicht eingeführt. Sobald sich der Katheter im Lumen der Arterie befand, wurde die Klemme gelöst und der Polyethylen-Katheter (PE-Katheter) mit Haltefäden fixiert. Bereits während der chirurgischen Präparation konnte nun über ein Druckabnahmesystem (Becton Dickinson Critical Care Systems Pte Ltd, Singapur), das mit dem Überwachungsmonitor (PowerLab 8/35, LabChart V7, ADInstruments, Oxford, Great Britain) verbunden war, der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) und die Herzfrequenz gemessen werden.

Die Messung des Herzzeitvolumens (HZV) mittels Thermodilution erfolgte zwischen dem Katheter in der *Vena jugularis interna* und einem Thermokatheter (MLT 1450 T-Type, AD Instruments, Oxford, UK) in der linken *Arteria carotis communis*. Zu diesem Zwecke begann der letzte Schritt der chirurgischen Präparation mit der stumpfen Präparation und Eröffnung der *Vagina carotica*. Die linke *Arteria carotis communis* wurde bis zur Fixierung des Katheters nach kaudal abgeklemmt. Danach wurde das Gefäß eröffnet, der Katheter etwa 1cm vorgeschoben und fixiert. Erst im Anschluss daran wurde der eigentliche Thermokatheter, der vom PE-Katheter umhüllt war, etwa 5 mm vorgeschoben, sodass die Körperkerntemperatur der Ratte gemessen werden konnte.

Nach der operativen Vorbereitung wurden die Hautschnitte mit Mullkompressen (Gazin®; Lohmann & Rauscher International GmbH & Co.KG, Rengsdorf, Deutschland) abgedeckt, um den Flüssigkeitsverlust über die offenen Wunden zu minimieren.

Medikament	Hersteller
Atracurium	Hexal, Holzkirchen, Deutschland
Bupivacain	actavis Group PTC ehf, Hafnorfjörður, Island
Pentobarbital	Merial, Halbergmoos, Deutschland
Sevofluran	Baxter, Deerfield IL, USA
Sterofundin BG5®	B. Braun, Melsungen, Deutschland
TNFα = Tasonermin	Böhringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland

Tabelle 3: Liste der verwendeten Medikamente und Chemikalien.

5.1.4. Versuchsaufbau zur Atemluftanalyse

Bevor das Versuchstier an die Beatmungseinheit angeschlossen werden konnte, wurde zuerst die Raum- und Beatmungsluft gemessen, um eine mögliche Kontamination zu detektieren. Zur Verringerung zusätzlicher Störfaktoren wurde das Beatmungsgerät eine Stunde vor und während des gesamten Versuchszeitraums mit synthetischer Luft höchsten Reinheitsgrades (O_2 20,5 Vol-%, N_2 79,5 Vol-%, CO_2 <100 ppb, CO <100 ppb, Kohlenwasserstoffe <50 ppb, Stickoxide <10 ppb, SO_2 <5 ppb, H_2S <5 ppb, H_2O <2 ppm; Air Liquide, Ludwigshafen, Deutschland) betrieben. Außerdem wurden nur Beatmungs- und Probeschläuche aus Polytetrafluorethylen (Bohlender, Grünsfeld, Deutschland) und Konnektoren aus Edelstahl verwendet. Dadurch wurden weitere Störsignale, die von den Materialien entstammen oder durch Resorption durch die Versuchsmaterialien entstehen könnten, auf ein Minimum reduziert.

Das Beatmungsgerät wurde zu Beginn auf eine Atemfrequenz von 65 min^{-1} , eine Inspirations-Ratio von 45% und einen positiven endexpiratorischen Druck von 1-2 cm Wassersäule eingestellt. Das Tidalvolumen wurde dem physiologischen Bewegungsprofil der Thoraxwand angepasst, was in etwa 8 ml/kgKG entspricht. Zur Kontrolle der beatmungsabhängigen Parameter wie pO_2 , pCO_2 und des Säure-Basen-Haushalts wurden regelmäßig Blutgasanalysen (BGA) durchgeführt und bei pathologischen Abweichungen die Beatmungseinstellungen entsprechend korrigiert. Kurz bevor die Versuchstiere über die Trachealkanüle mit dem Beatmungsgerät verbunden wurden, wurde das Muskelrelaxans Atracurium (Hexal, Holzkirchen, Deutschland) über den ZVK verabreicht, um so ein Gegenatmen zu verhindern. Ehe den Versuchsgruppen die Studienmedikation verabreicht wurde, erfolgte eine 30-minütige Adaptationsphase an die maschinelle Beatmung. In dieser Zeit wurden sowohl die Ausgangswerte der Vitalparameter als auch die erste Atemluftanalyse erhoben. Die automatische Probenentnahme erfolgte alle 20 Minuten am Expirationsschenkel der Beatmungseinheit, an welchem der Probenschlauch im Seitenstromprinzip direkt mit dem MCC-IMS (B&S Analytik GmbH, Dortmund) verbunden war (*Abbildung 2*). Dabei wurde über 20 Sekunden eine Luftprobe von 10 ml entnommen. Dies stellte keine wesentliche Beeinträchtigung der Hämodynamik oder der respiratorischen Funktion der Ratten dar.

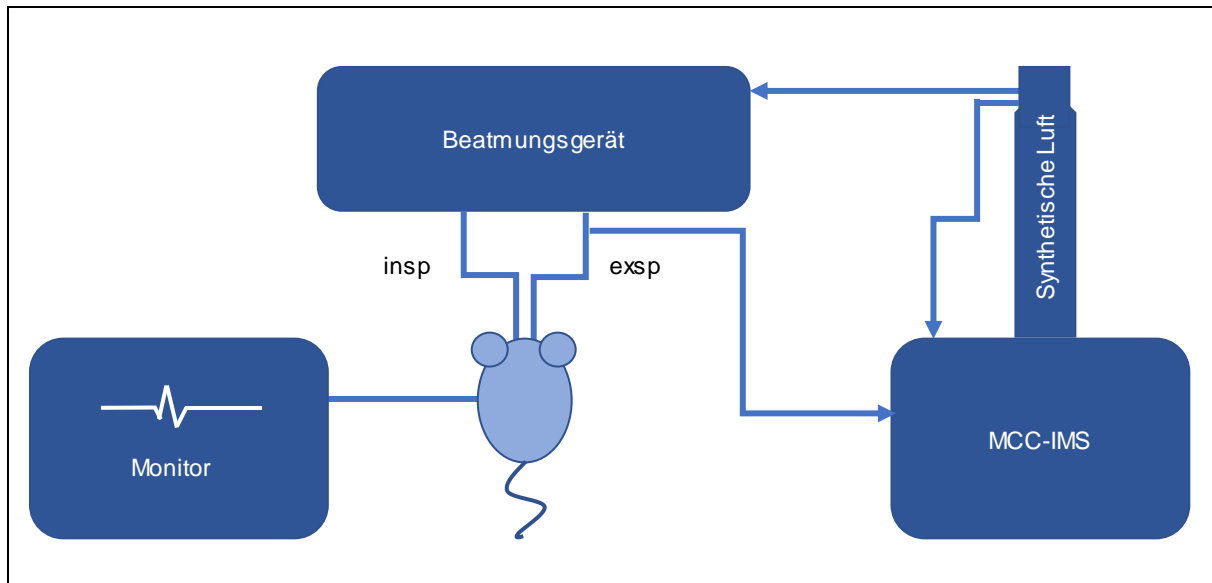


Abbildung 2: Tierexperimenteller MCC-IMS Arbeitsplatz. Monitor zur Überwachung der Vitalparameter; insp: inspiratorischer Beatmungsschenkel; exp: expiratorischer Beatmungsschenkel. MCC-IMS: Multikapillarsäulen-ionenmobilitätsspektrometer, Synthetische Luft für Beatmungsgerät und MCC-IMS. Modifiziert nach [185].

5.1.5. Versuchsgruppen

Zur IMS-Messung von VOCs in der Ausatemluft bei systemischer Inflammation wurden drei Versuchsgruppen mit jeweils 10 männlichen Sprague-Dawley® Ratten untersucht. Eine Gruppe diente dabei als Kontrollgruppe, welcher kein TNF- α zur Induktion einer systemischen Inflammation verabreicht wurde. Mithilfe des Atemluftprofils dieser Gruppe konnten Signale aufgezeichnet werden, die im physiologischen Atemluftprofil der Ratte zu finden sind. Die zwei Interventionsgruppen dienten zur Messung von spezifischen volatilen Biomarkern, die während einer Inflammation in der Ausatemluft zu detektieren sind.

5.1.5.1. Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe, bestehend aus 10 randomisiert ausgewählten männlichen Sprague-Dawley® Ratten, erhielt eine Basisinfusion mit 5% Glucose (Sterofundin BG5®, B. Braun, Melsungen, Deutschland) bei einer Infusionsrate von 0,5 ml/100gKG/h. Daraus ergibt sich über 24 h eine Glucosezufuhr von 200 kJ/kg, was einem Drittel des Grundumsatzes einer Ratte entspricht. Im Rahmen der Verblindung

bekamen auch die Tiere der Kontrollgruppe zu Beginn der Untersuchung eine Vehikellösung verabreicht. Welche Tiere TNF- α und welche die Vehikellösung als Studienmedikation verabreicht bekommen haben, wurde zufällig ausgewählt und bis zum Ende aller Untersuchungen nicht erkennbar gemacht.

5.1.5.2. Inflammationsgruppe

Auch die Inflammationsgruppe erhielt als Basisinfusion Sterofundin BG5®. Zur Induktion einer Inflammation wurde das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α (Tasonermin, Böhlinger Ingelheim, Ingelheim, Deutschland) zu Beginn der Untersuchung verabreicht. Die Inflammationsgruppe teilte sich wiederum in zwei Untergruppen. Die erste Gruppe (n=10) bekam nach einer halbstündigen Adaptationszeit an die maschinelle Beatmung eine Dosis von 200 $\mu\text{g/kgKG}$ TNF- α (Niedrigdosis-Gruppe) injiziert. Der zweiten Versuchsgruppe (n=10) wurde nach einer gleichen Adaptationszeit 600 $\mu\text{g/kgKG}$ TNF- α (Hochdosis-Gruppe) appliziert.

5.1.6. Versuchsprotokoll

Der Beobachtungszeitraum für die Kontrollgruppe sowie für die Inflammationsgruppen wurde auf 24 h begrenzt. Die Vitalparameter der Versuchstiere (systolischer, diastolischer und mittlerer arterieller Blutdruck, Beatmungsdruck, Herzfrequenz, Körpertemperatur) wurden fortlaufend digital aufgezeichnet (PowerLab 8/35, LabChart V7; ADInstruments, Oxford, Great Britain). Zu Beginn und im weiteren Abstand von 4 h erfolgten Blutentnahmen aus dem *Arteria femoralis*-Katheter zur Blutgaskontrolle (je 0,1ml Blut pro Zeitpunkt), sowie zu Versuchsbeginn und nach 12 h zur Untersuchung von Zytokinen (je 0,5ml Blut pro Zeitpunkt) (*Abbildung 3*). Zusätzlich wurde alle 4 h das HZV mithilfe der transpulmonalen Thermodilutionstechnik gemessen. Versuchstiere, die nach Ablauf des Versuchszeitraums noch lebten, wurden in tiefer Narkose durch eine Überdosis Pentobarbital getötet.

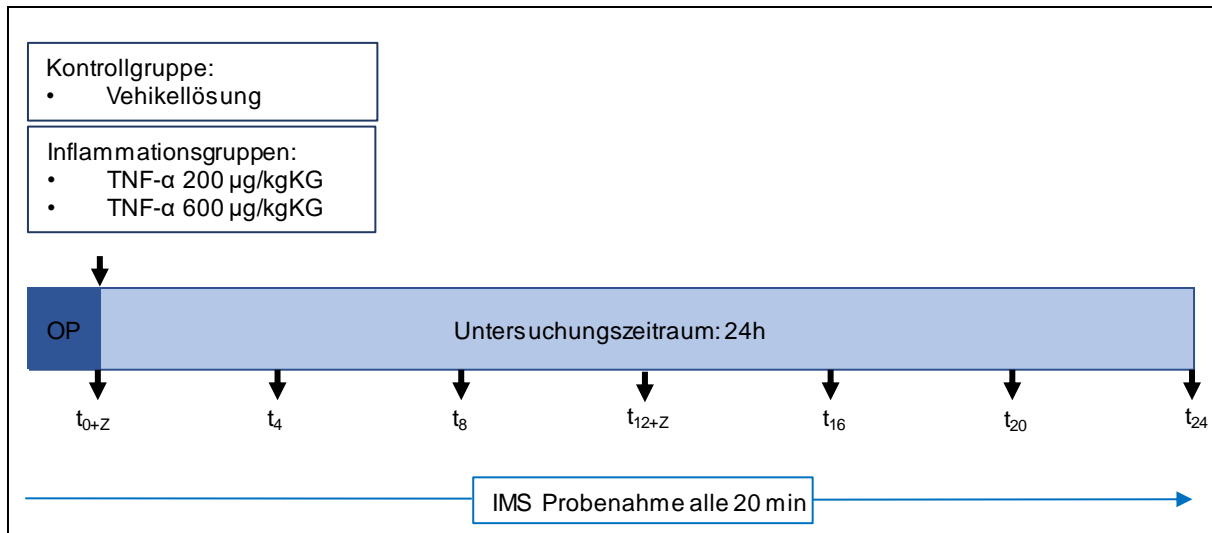


Abbildung 3: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Versuchsgruppen. Zur Gruppenübersicht siehe Kapitel 5.1.5.1. TNF- α : Tumornekrosefaktor- α , t_x : Blutgasanalyse, t_{x+z} : Zytokinanalyse.

5.2. Atemluftmessung mit Ionenmobilitätsspektrometrie

5.2.1. Vortrennung des Gasgemisches durch eine Multikapillarsäule

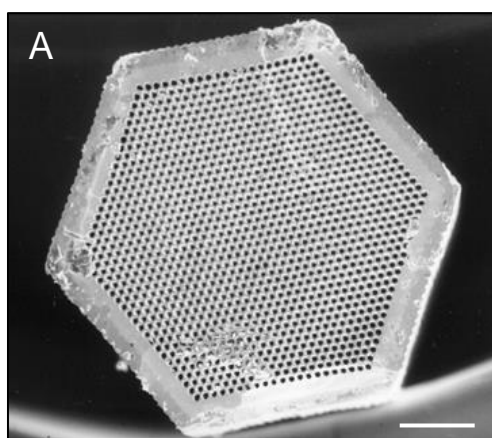
Ein Problem bei der Analyse von Ausatemluft mit hohen Wasserdampfkonzentrationen (relative Feuchte 100 %) und komplexen Gasgemischen kann entstehen, wenn sich die Signale der einzelnen Analyt-Ionen überlagern und so nicht sicher identifizierbar sind.

Bei vermehrtem Aufkommen von H_2O im Analyt entstehen bei radioaktiver Strahlungsquelle vermehrt hydratisierte Monomere und Dimere, die sich im Spannungsfeld langsamer bewegen und dadurch verfälschte IMS-Signale erzeugen. Deswegen wurde in der vorliegenden Untersuchung das IMS-Gerät mit einer Multikapillarsäule (MCC) gekoppelt.

Die MCC setzt sich aus bis zu 1200 Einzelkapillaren zusammen, die parallel angeordnet zu einer einzigen Glassäule kombiniert sind. Die Länge einer Einzelkapillare kann zwischen 50-300 mm und der Innendurchmesser zwischen 50-250 μm betragen (*Abbildung 4, A*). Durch die Vortrennung mittels MCC trägt ein weiterer Parameter, die Retentionszeit, zur erhöhten Selektivität und Empfindlichkeit des IMS bei. Die Retentionszeit beschreibt die Zeit, die ein Analyt während der Passage durch die Einzelkapillare benötigt.

Eine MCC trennt Gasgemische binnen Sekunden in Raumtemperatur, kann jedoch je nach Fragestellung und Anforderung des Analyts bei bis zu 250°C betrieben werden. Mit Durchflussraten von 15-300 ml/h können diese an die Gasflüsse des IMS angepasst werden. Zudem ist die Retentionszeit in der MCC relativ unempfindlich gegenüber Flussschwankungen im Trägergas, sodass beispielsweise bei tragbaren Instrumenten auf eine aufwendige Druckregulierung weitestgehend verzichtet werden kann.

Die Betriebsparameter der hier verwendeten MCC-OV5 (Multichrom, Moskau und Novosibirsk, Russia) sind in Abbildung 4, B aufgeführt.



B

Betriebsparameter des MCC-OV5

Temperaturbereich	max. 250 °C
Trägergasfluss	5 - 300 ml/min
Säulenlänge	bis 100 cm
Bodenzahl / m	5000
Anzahl der gebündelten Kapillaren	900 - 1200
Innendurchmesser der Kapillaren	43 µm
Säulendurchmesser	3 mm
Polarität	polar / unpolar
Filmdicke	200 nm

Abbildung 4: A: Querschnitt durch eine Multikapillarsäule (MCC). Entnommen aus Baumbach *et al.* [9]. Maßstab: 0,4 mm. B: Betriebsparameter des MCC-OV5.

5.2.2. Aufbau und Funktion eines Ionenmobilitätsspektrometers

Zur Analyse von flüchtigen Stoffwechselprodukten in der Ausatemluft ist ein Gerät nötig, welches Analyt-Moleküle in Konzentrationen von ng/l bis pg/l (ppm-ppt) detektiert, unterschiedliche chemische Substanzklassen voneinander unterscheiden kann und eine möglichst kurze Analysezeit benötigt, um so Messungen direkt am Versuchstier bzw. am Patienten durchführen zu können.

Das Ionenmobilitätsspektrometer (IMS) besteht aus drei Hauptkomponenten: dem Ionisationsraum, in welchem die Analyt-Moleküle ionisiert werden, der Driftröhre zur Trennung der Analyt-Ionen und der Faraday-Platte, auf welcher die auftreffenden Analyt-Ionen ein elektrisches Signal erzeugen (*Abbildung 5*).

Die Probe gelangt zusammen mit einem Trägergas (*i.e.* Stickstoff, Luft) über ein Probeneinlasssystem kontrolliert in den Ionisationsraum. Durch geeignete Ionisationsquellen (*i.e.* radioaktive Strahlungsquellen, UV-Strahlungsquellen, Teilentladungen, Laserlicht, Elektrospray) werden die in dem Trägergas befindlichen Analyt-Moleküle ionisiert. Für diese Versuchsreihe wurde ein IMS mit einer ^{63}Ni -Strahlungsquelle (Bioscout 2011, 550 MBq, B&S Analytik, Dortmund, Deutschland) verwendet.

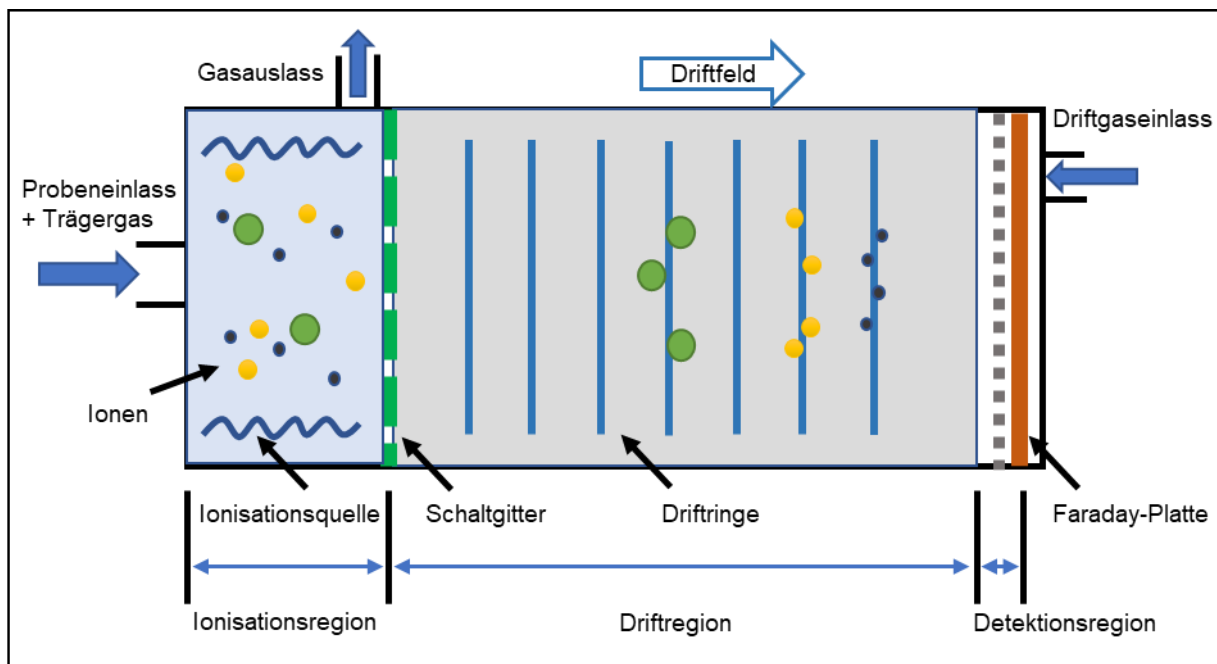


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Ionenmobilitätsspektrometers (IMS). Modifiziert nach [29, 30].

Durch Betazerfall des Nuklids ^{63}Ni entstehen β -Teilchen, die mit einer Energie von 67 keV emittiert werden und bei dem Zusammenstoßen mit Gasmolekülen zu deren Ionisation führen. Wird Luft als Trägergas verwendet, werden etwa 35 keV zur Bildung eines Ionenpaares benötigt, wobei der Großteil der Energie der β -Teilchen in kinetische Energie der gebildeten Ionen umgewandelt wird. Zuerst werden die Trägergasmoleküle ionisiert und im Anschluss daran entstehen Reaktionsionen. Dieser Vorgang wird als indirekter Ionisationsprozess bezeichnet. Als Reaktionsionen entstehen überwiegend $\text{H}^+(\text{H}_2\text{O})_n$ und negative $\text{O}_2(\text{H}_2\text{O})_m$ Ionen (n, m = ganze Zahlen, i.d.R. zwischen 2 und 6). Durch Protonen- bzw. Elektronentransfer werden schließlich die Analyt-Moleküle selbst ionisiert, die nun im IMS-Spektrogramm neben dem Reaktionsionen-Peak als eigenes Signal zu erkennen sind. Die Stärke der

Ionisationsquelle bestimmt die Gesamtladung aller Reaktionsionen und begrenzt dadurch die Anzahl an Molekülen, die vom IMS ionisiert werden können.

Die Ionenschwärme aus dem Ionisationsraum gelangen anschließend durch ein sich periodisch öffnendes Schaltgitter in den nächsten Funktionsraum, die Driftröhre. Das Schaltgitter setzt sich aus einer Anordnung nach Tyndall zusammen. Dieses Tyndall-System besteht aus zwei Einzelgittern, die sich wiederum aus parallel angeordneten Drähten im Abstand von 1 mm zusammensetzen. Das Gitter ist immer dann geschlossen, wenn das zwischen den Gitterdrähten erzeugte elektrische Feld senkrecht zu dem in der Driftröhre steht. Nach Passage des Schaltgitters gelangen die Ionen in die Driftröhre. Hier wandern sie unter dem Einfluss des erzeugten elektrischen Feldes von 200 bis 500 V/cm in Richtung der sogenannten Faraday-Platte. Diese Elektrode dient als Detektor der zu analysierenden Ionen. Die Driftröhre besteht aus Anordnungen von Metall- und Isolator-Ringen, die aus Keramik, Glas oder Teflon bestehen können. Für die Homogenität des elektrischen Feldes in Längsrichtung ist das Verhältnis des Radius der Metallringe zu ihrem Abstand bedeutend. Während der Passage durch die Driftröhre stoßen die Analyte mit Molekülen des Driftgases zusammen. Das Driftgas wird auf der Seite der Faraday-Platte eingelassen und bewegt sich folglich entgegen der Stromrichtung der zu analysierenden Ionen. Durch das Zusammenstoßen der Analyt-Ionen mit den neutralen Molekülen des Driftgases werden die Ionen nach Masse und Gewicht getrennt. So können selbst gleich geladene Ionen voneinander unterschieden werden, da jedes Analyt-Ion eine eigene Driftgeschwindigkeit aufweist.

Am Ende der Driftregion befindet sich eine Elektrode, die sog. Faraday-Platte. Auf die Faraday-Platte auftreffend erzeugen die Ionen ein elektrisches Signal, das von einem Spannungsumwandler verstärkt wird und so ein Messsignal bildet. Das IMS-Spektrum ergibt sich schlussendlich durch das Auftragen der Signalintensität gegen die Driftzeit (*Abbildung 6, A*).

Die Polarität des IMS-Geräts kann verändert werden, um eventuelle Überlagerungen verschiedener Ionensignale zu reduzieren, die nur bei einer Polarität auftreten. Ein weiteres Problem stellen Moleküle mit hoher Protonenaffinität dar, weil diese bei hoher Wasserdampfkonzentration erschwert ionisieren. Allerdings ist dieses Problem beeinflussbar durch die Temperatur, da die Ion-Wasser-Cluster bei steigender Temperatur an Stabilität einbüßen. Aus diesem Grund wurde das IMS-Gerät mit einer Temperatur von 40 °C betrieben.

Für die hier aufgeführten Untersuchungen wurde ein Bioscout 2011 MCC-IMS mit folgenden Betriebsparametern verwendet (*Abbildung 6, B*).

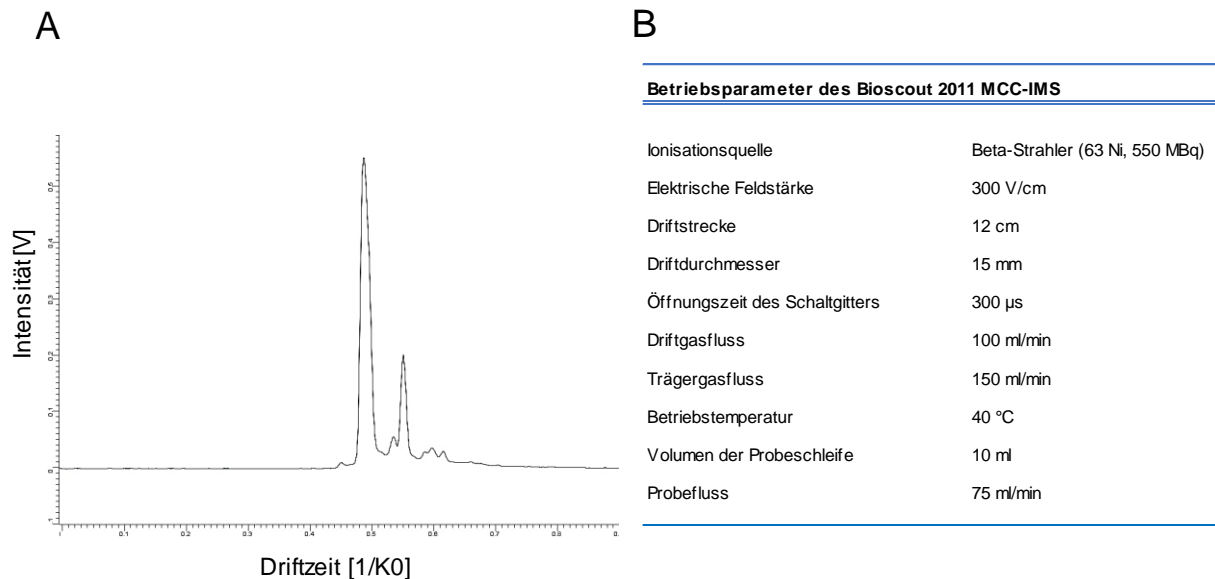


Abbildung 6: **A:** Beispiel eines IMS-Einzelspektrums in der Ausatemluftanalyse. $1/K0 \triangleq$ reduzierte Ionenmobilität: $[cm^2/Vs]$. **B:** Betriebsparameter des Bioscout 2011 MCC-IMS.

5.3. ELISA-Messung zur Zytokinbestimmung

Die Bestimmung der Zytokinkonzentration im Plasma der Versuchstiere erfolgte mit handelsüblichen Enzyme-linked Immunosorbent Assay-Kits (ELISA-Kits; Firma BD Biosciences, San Diego, USA) nach Angaben des Herstellers. Zwischen der Versuchsdurchführung und der ELISA-Messung lagen höchstens drei Monate. Die Messung wurde gemäß dem Sandwich-Verfahren durchgeführt, bei dem zwei Antikörper an jeweils unterschiedlichen Stellen (Epitope) des zu bestimmenden Antigens binden (*Abbildung 7*).

Der erste Antikörper, ein sog. Fänger-Antikörper, ist an einer festen Phase, in diesem Fall an eine Mikrotiterplatte, gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird auf die Mikrotiterplatte gegeben, sodass der Fänger-Antikörper während der Inkubationszeit an ein spezifisches Epitop des Antigens binden kann. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden ungebundene Bestandteile abgewaschen und ein Peroxidase-Antikörper zur Detektion (Detektions-Antikörper) hinzugegeben. Dieser enzymgekoppelte Detektions-Antikörper erkennt und bindet an ein anderes Epitop als

der Fänger-Antikörper. Nach Zugabe des Detektions-Antikörpers entsteht nun das typische Bild des Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes, das dem Verfahren den Namen Sandwich-ELISA gab.

Um überschüssige Detektions-Antikörper zu entfernen, wird die Mikrotiterplatte ein weiteres Mal gewaschen, sodass ausschließlich das zu messende Antigen gebunden an die Antikörper übrigbleibt. Nun kann das Antigen detektiert und quantifiziert werden. Dazu wird ein Peroxidase-abhängiges Substrat hinzugegeben, das eine Farbreaktion hervorruft, die proportional zu der Menge des Antigens ist. Um ein Fortfahren des Farbumschlags zu beenden, wird nach einer weiteren Inkubationszeit von 15-30 min in Dunkelheit 1-molare Schwefelsäure beigelegt.

Die photometrische Bestimmung der Farbreaktion erfolgt mit einem ELISA-Reader (ELx800™ Absorbance Microplate Reader; BioTEK® Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland) und der dazugehörigen Gen5™ Software (BioTEK® Instruments GmbH). Um eine Kalibrierungskurve für das gemessene Antigen zu erhalten, wurden in die ersten beiden Reihen der Mikrotiterplatte rekombinante Zytokine als Verdünnungsreihe aufgebracht. Die minimal messbare Zytokinkonzentration liegt laut Hersteller bei 2 pg/ml.

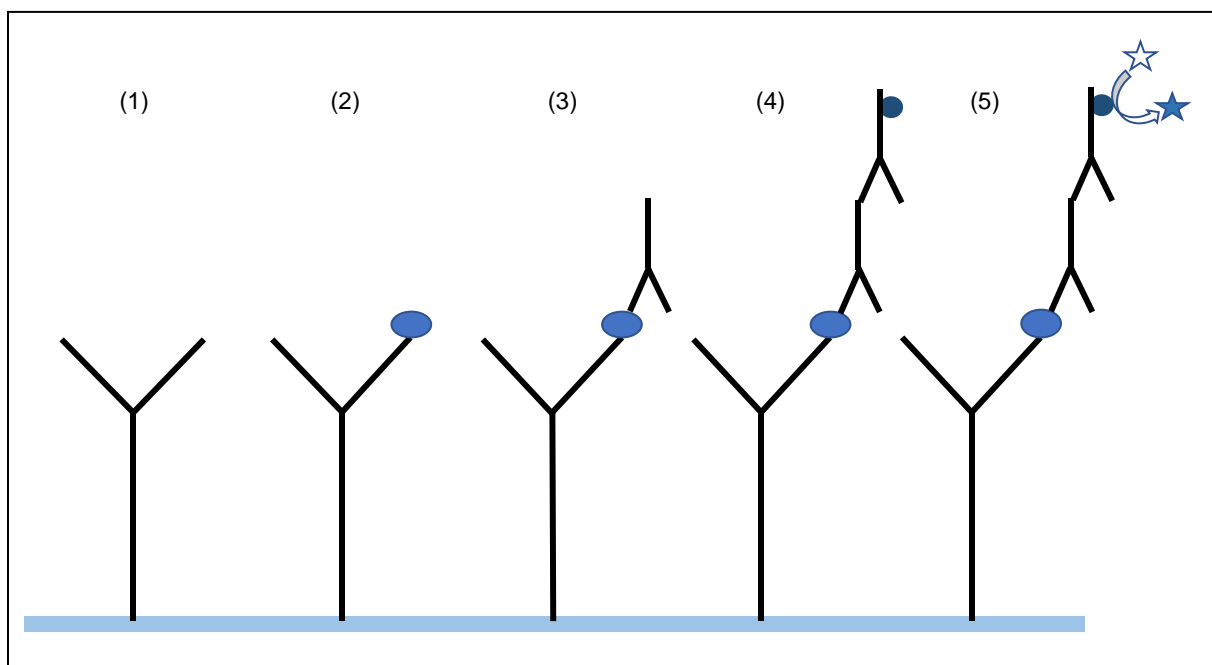


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA. (1) Fänger-Antikörper (Y) auf Mikrotiterplatte (hellblauer Strich); (2) Hinzufügen des Antigens (blaues Oval), (3) Detektions-Antikörper bindet an Antigen (gedrehtes Y), (4) Zugabe eines Enzym-gekoppelten Antikörpers (dunkelblauer Kreis), (5) Farbreaktion (weißer Stern wird zu blauem Stern).

5.4. HovaCal

Ein Hot-Vapour-Calibration-Prüfgasgenerator (HovaCal) wird zur Herstellung von Prüfgasen definierter Konzentrationen genutzt. Bei der hier vorliegenden Untersuchung wurde eine TNF- α -Lösung gemessen, um so etwaige Korrelationen zwischen Signalen der Lösung und inflammatorischen Atemluftsignalen der Versuchstiere aufzuzeigen. Dazu wurde die Lösung unter kontinuierlicher Beimengung eines Trägergases verdampft. Über die Einstellung des Mengenverhältnisses von Lösung und Trägergas kann die gewünschte Konzentration des zu messenden Analyten hergestellt werden.

Für die hier vorliegenden Untersuchungen wurde ein HovaCAL 4836-VOC (IAS GmbH, Oberursel, Deutschland) genutzt, der über die Software viewCal 4836 (IAS GmbH, Oberursel, Deutschland) gesteuert wurde. Der Kalibriergasgenerator HovaCal 4836-VOC ist aus drei Stufen aufgebaut (*Abbildung 8*).

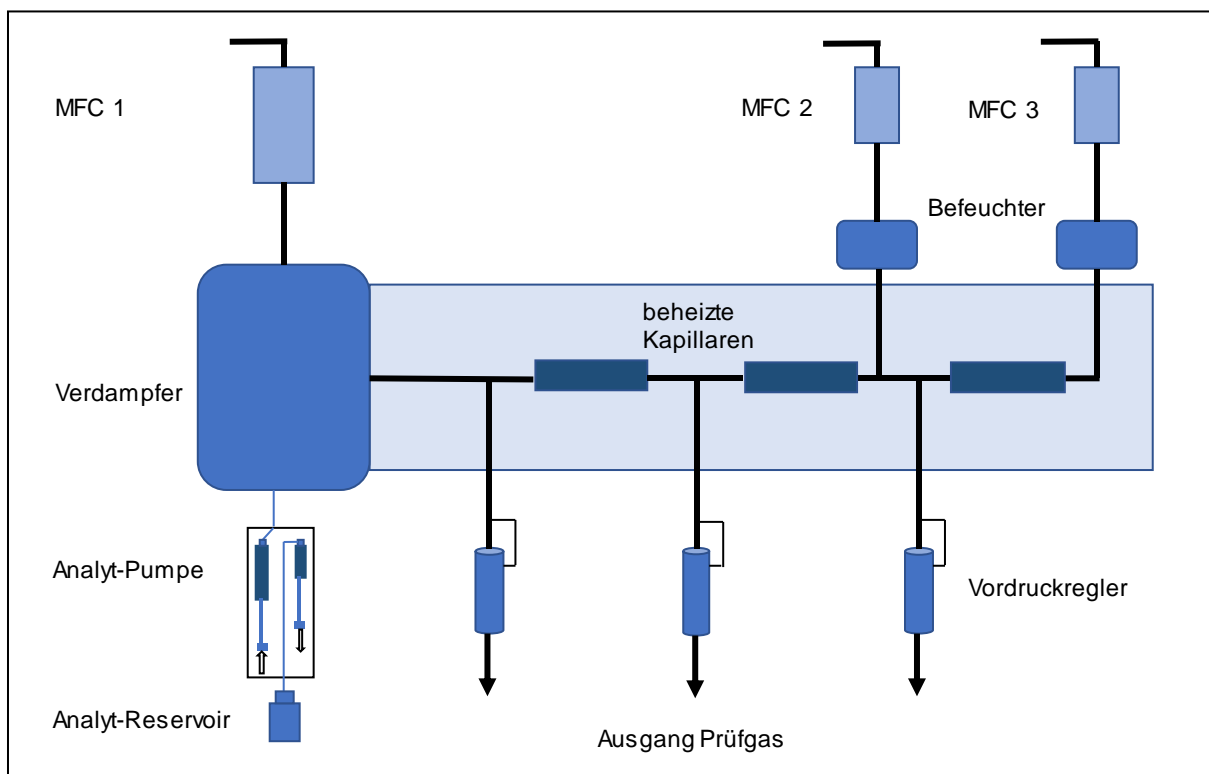


Abbildung 8: Schematische Darstellung des HovaCal 4836-VOC. Zu messende Substanz wird im geheizten Verdampfer eingelassen und mit Trägergasstrom gemischt. Das entstandene Gas-Dampf-Gemisch wird aus dem Verdampfer gelassen und weiter verdünnt. MFC: Massendurchflussregler. Modifiziert nach [166].

In Stufe 1 wird zuerst über ein Spritzenpumpenmodul die zu messende Substanz in einen geheizten Verdampfer eingelassen und dort mit einem definierten Trägergasstrom (Massendurchflussregler = MFC) gemischt. Das Spritzenpumpenmodul funktioniert nach dem Push-Pull-Prinzip: während die eine Spritze Flüssigkeit fördert, wird die andere Spritze automatisch für den Folgehub befüllt. Um eine kontinuierliche Förderung zu gewährleisten, sind die Umschaltvorgänge der totvolumenarmen Drehschieberventile zeitlich etwas versetzt, sodass diese sich überlappen und ein Dauerbetrieb möglich ist.

Der Verdampfer ist tränergasgestützt, sodass ein Mindestgasfluss nötig ist, um ein kontinuierliches Verdampfen zu gewährleisten. Der Gasstrom in Stufe 1 beträgt 1,5 NI/min und wird über den Massendurchflussregler (MFC1) eingeteilt. Die Temperatur des Verdampfers kann zwischen 60 °C und 180 °C eingestellt werden und sollte für das zu verdampfende Gemisch so gewählt werden, dass die Temperatur deutlich über dem zu erwartenden Taupunkt liegt. Das nun entstandene Gas-Dampf-Gemisch kann nach dem Verdampfer aus dem System abgeleitet werden.

Das Gemisch aus Analyt und Trägergas wird über einen Bypass und ein Kapillarsystem aus dem Verdampfer gelassen und mit einem definierten Verdünnungsgasstrom gemischt und in Folge dessen weiter verdünnt.

Die elektronischen Vordruckregler regeln den konstanten Durchfluss des Gasgemisches durch die beheizte Kapillare.

Im Verdünnungssystem (Stufe 2 und 3) wird über beheizte Kapillaren, einem weiteren MFC für Verdünnungsgas (MFC2 und MFC3) und zwei Druckreglern ein noch größeres Verdünnungsverhältnis eingestellt. Die beheizten Kapillaren sorgen für konstante Bedingungen für den Durchfluss des Gasdampfstroms (vor allem dessen Viskosität) und minimieren zusätzlich Adsorptionseffekte. Der dampfbeladene Gasstrom kommt während der Passage nur mit den beheizten Kapillaren in Kontakt, wodurch die Verunreinigung von kalten Oberflächen umgangen wird.

Durch das Verdünnungssystem können Verdünnungsverhältnisse von bis zu 1/2.000.000 erreicht werden. Zusammen mit dem Vorgemisch aus Stufe 1, das Konzentrationen von 100 ppm bis 10.000 ppm aufweisen kann, ist es demnach möglich, Konzentrationen von ca. 50 ppb bis 50 ppt bei Reinsubstanzen zu erzielen. Allerdings sind auch erheblich geringere Konzentrationsbereiche realisierbar, wenn anstelle einer Reinsubstanz Lösungen mit Dotierkonzentrationen verwendet werden. Laut Hersteller ist es möglich, mit 1.000 ppm-Lösungen Konzentrationen zwischen

0,05 ppt bis 50 ppt herzustellen. Jede Stufe des HovaCal kann über ein separates Dosier- und Verdampfersystem befeuchtet werden (*Tabelle 4*) [118, 166].

Technische Daten des HovaCal® 4836-VOC	
Gasdurchfluss MFC1, MFC2, MFC3	100 - 2000 ml/min
Gastemperatur Eingang Massenflussregler	+ 5 °C bis + 50 °C
Gastemperatur Ausgang Naherhitzer	bis + 200 °C
Gasdruck vor Massenflussregler	3 - 6 bar
Anwärmzeit	1 h
Medienberührte Materialien	Edelstahl 1.4571, PEEK, PFA, PTFE, Viton®
Umgebungstemperatur im Betrieb	+ 5 °C bis + 40 °C
Umgebungstemperatur bei Lagerung und Transport	+ 5 °C bis + 60 °C
Versorgungsspannung	AC 220-240 V, 48 - 62 Hz
Leistungsaufnahme	2200 W

Tabelle 4: Technische Daten des HovaCal 4836-VOC.

5.5. Patientenmessung

5.5.1. Patient

Eine Patientin mit der Diagnose eines malignen Melanoms wurde in die vorliegende Arbeit zur Atemluftanalyse bei Behandlung mit TNF- α im Zuge einer isolierten Extremitätenperfusion (isolated limb perfusion, ILP) eingeschlossen. Die Untersuchung erfolgte nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes (Nummer 48/11). Die bisherige Behandlung der Patientin war bis dahin ohne wesentlichen Einfluss auf die Grunderkrankung, weshalb ein kurativer Ansatz mittels ILP angestrebt wurde. Das Therapieziel war die Elimination der Tumorzellen. Das Ziel der Untersuchung war der Nachweis inflammatorischer Parameter in der Ausatemluft nach TNF- α -Gabe. Die Aufklärung und Zustimmung zur Atemluftanalyse der Patientin wurde entsprechend der Stellungnahme der Ethikkommission im Rahmen eines informed consent ausgeführt. Die Operation wurde in Allgemeinanästhesie und maschineller Beatmung nach Intubation der Patientin durchgeführt.

Die IMS-Probenentnahme erfolgte automatisiert im Abstand von 20 Minuten aus dem Expirationsschenkel des Beatmungsgeräts, was weder eine hämodynamische noch respiratorische Einschränkung verursachte.

5.5.2. Isolierte Extremitätenperfusion mittels TNF- α

Wenn keine chirurgische Resektion im Gesunden möglich ist, kann bei einem bösartigen Tumor im Extremitätenbereich eine antineoplastische Therapie von lokoregionalen Metastasen durch eine ILP durchgeführt werden. Hierbei werden der große Kreislauf und der Kreislauf einer Extremität in Vollnarkose voneinander getrennt. Zuerst wurde die Blutzufuhr des linken Beins der Studienpatientin unterbrochen und ein extrakorporaler Kreislauf etabliert. Im gesonderten Kreislauf wurde eine milde Hyperthermie von 39 °C bis 40 °C angestrebt. Durch die Kollegen der Nuklearmedizin erfolgte die Überwachung des Shuntvolumens. Die Leckage wurde kontinuierlich während der ILP mittels Tracer-Messung überprüft. Die eigentliche Behandlung bestand aus der Perfusion der linken Extremität mit 10 mg Melphalan / Liter perfundiertem Extremitätenvolumen (Aspen Pharmacare, KwaZulu-Natal, Südafrika) und zusätzlicher Gabe von 3-4 mg TNF- α (Tasonermin, Boehringer Ingelheim, Deutschland) über 90 Minuten. Die Gabe von TNF- α induzierte hierbei eine Entzündungsreaktion. Dadurch bestand die Möglichkeit auch beim Menschen VOCs in der Atemluft zu detektieren, die während Inflammation entstehen. Erst nach sorgfältiger Eliminierung von TNF- α aus dem Extremitätenkreislauf wurde die Isolierung des linken Beins aufgehoben.

5.6. Signalauswertung

Die Software Visual Now (Version 3.1; B&S Analytik, Dortmund, Deutschland) diene zur Identifizierung sowie Quantifizierung der gefundenen Analyte im IMS. Aufgezeichnete Signale mit einer Signalstärke von 1 mV bis 5 V wurden als Peak definiert, da 1 mV dem Fünffachen des Hintergrundrauschens der IMS-Signale entspricht und 5 V, da dies die obere Detektionsgrenze der maximal möglichen Ionisation der Ni⁶³-Ionisationsquelle darstellt.

Die Lokalisation der Signale erfolgte anhand der Drift- und Retentionszeit (*Abbildung 9*). Um Peaks zu identifizieren, wurde bei der hier vorliegenden Versuchsdurchführung die Software MIMA (Version 1.1.2., KIST Europe, Saarbrücken, Deutschland) zusammen mit der MCC-IMS Database Version 1209 (B&S Analytik, Dortmund, Deutschland) angewandt. Mithilfe der vorliegenden Datenbank konnten gemessene Signale mit dieser verglichen werden. Die Reinsubstanz-Datenbank wurde gaschromatographisch erstellt und so konnte die Lokalisation von unbekannten Analyten aus der Versuchsprobe mit schon bekannten Positionen einer Einzelsubstanz aus der Datenbank verglichen werden. Die letztendliche Identifikation erfolgte dann über die höchste Wahrscheinlichkeit einer Überlappung. War diese Übereinstimmung zwischen Datenbank und Peak nicht vollends gegeben, wurde der Peak mit der kürzesten euklidischen Distanz angegeben oder das gemessene Signal als „unknown“ bezeichnet.

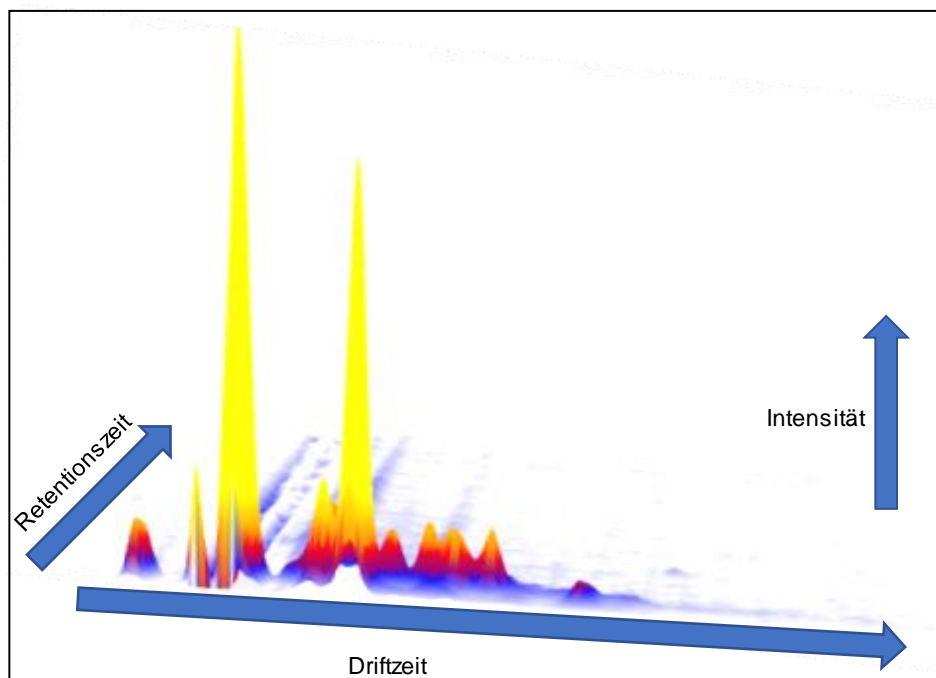


Abbildung 9: Beispiel eines 3D-Spektrogramms mit den Parametern Retentionszeit, Driftzeit und Intensität.

5.7. Software und Statistik

Zur Erstellung der Dissertationsschrift wurde Microsoft® Office Word® 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) verwendet und die Graphiken wurden mit

Microsoft® Power Point® 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) und SigmaPlot (Version 12.5; Systat Software Erkrath, Germany) angefertigt.

Zur Studienplanung sowie zur statistischen Auswertung wurde die Software SigmaPlot und Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) verwendet. Die Tiere wurden mit Hilfe eines Zufallszahlengenerators in drei Gruppen randomisiert (Excel 2016, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Von allen Messwerten dieser Untersuchungen wurde eine deskriptive Statistik erstellt. Zuerst wurde die Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnow-Test überprüft und danach eine Varianzanalyse (one way ANOVA) zum statistischen Vergleich zwischen den Versuchsgruppen durchgeführt. Im weiteren Verlauf wurde als post hoc Test die Holm-Sidak Methode angewendet. Mittels Varianzanalyse für ungebundene Stichproben (repeated measure ANOVA) wurde der Vergleich innerhalb der Gruppen ermittelt und das Ergebnis anschließend mittels post-hoc-Tests (Holm-Sidak Methode) zur Korrektur für multiple Vergleiche überprüft. Nur wenn die Voraussetzungen zur Durchführung von parametrischen Testverfahren nicht erfüllt wurden, wurden stattdessen nicht-parametrische Testverfahren durchgeführt. Das Überleben wurde mit Hilfe der Kaplan-Meier Methode und des Log-Rank Tests berechnet. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant definiert. Die Voruntersuchungen zur Etablierung von IMS-Messungen an beatmeten Ratten und veröffentlichte Daten für die geplanten Untersuchungsmodelle wurden zur Planung der Fallzahlanalyse herangezogen [44, 185].

Angesichts kleinster Unterschiede in der Ausatemluft der verschiedenen Gruppen musste biomathematisch bei einer Gruppengröße von $n=10$ mit einer Power von 0,8 und einem α -Fehler von 0,05 ausgegangen werden.

6. ERGEBNISSE

6.1. Physiologisches Atemluftprofil der Ratte

Die gemessenen Signalintensitäten wurden mit den Signalen einer Gaschromatographie-IMS-Reinsubstanz Datenbank (Version 1209; B&S Analytik GmbH, Dortmund, Germany) verglichen. Bevor die Signale dem Atemluftprofil der Ratte zugeordnet wurden, musste zuerst verglichen werden, welche der detektierten Signale dem Beatmungsgerät und welche der Ratte selbst zugeschrieben werden konnten. Dazu diente eine einstündige Messung der Signale aus dem Beatmungssystem, bevor die Versuchstiere an den Respirator angeschlossen wurden. Nach einer Stunde Beatmungsdauer konnten 73 VOCs gemessen werden, die als Basis für das Atemluftprofil der gesunden Ratte während maschineller Beatmung angesehen wurden (*Tabelle 5*). 49 der 73 VOCs konnten mit Hilfe der Reinsubstanz-Datenbank identifiziert werden. 24 gemessene Analyte sind bis zum jetzigen Zeitpunkt noch unbekannt (NN). Von den gemessenen VOCs wurden 35 bereits während der alleinigen Messung des Beatmungssystems detektiert und demnach dem Respirator (R) zugeordnet (R1-R35). Letztendlich konnten 38 VOCs dem Atemluftprofil (AL) der Ratte zugeschrieben werden (AL0-AL37), da diese ausschließlich ab dem Zeitpunkt der Atemluftmessung zu messen waren.

Signal	Analyt	1/K0	RT	Signal	Analyt	1/K0	RT
R1	2-Methylpentan	0,51	7,4	AL0	Isopropylalkohol	0,53	1,30
R2	Ethanol	0,51	1,4	AL1	Aceton	0,55	1,20
R3	2-Pentanon (Monomer)	0,55	5,9	AL2	1-Propanol	0,63	2,60
R4	Cyclohexanon (Monomer)	0,57	11,6	AL3	2-Methylfuran	0,66	3,60
R5	1-Pentanol	0,61	8,0	AL4	NN	0,68	3,50
R6	2-Hexanon	0,58	5,9	AL5	1-Butanol	0,70	3,60
R7	5-Methyl-3-heptanon	0,63	16,3	AL6	Dimethylsulfid	0,50	5,80
R8	2-Ethyl-1-hexanol	0,70	33,1	AL7	3-Pentanon (Monomer)	0,55	8,20
R9	Nonan	0,73	57,3	AL8	NN	0,79	3,10
R10	2-Octanol	0,70	25,2	AL9	3-Pentanon (Dimer)	0,67	7,80
R11	1-Butanol	0,69	5,9	AL10	Hexanol	0,66	7,90
R12	n-Nonan	0,72	12,4	AL11	2-Hexanol	0,64	10,90
R13	NN	0,74	6,8	AL12	2-Heptanon	0,62	11,50
R14	1-Hexanol	0,80	8,0	AL13	NN	0,68	11,20
R15	2-Heptanol	0,83	16,3	AL14	2,2,4,6,6-Pentamethyl-heptan	0,67	29,10
R16	p-Cymol (Dimer)	0,83	28,1	AL15	NN	0,72	3,50
R17	NN	0,90	113,6	AL16	2-Heptanol	0,66	11,30
R18	(-)-Menthol	0,90	102,3	AL17	Acetophenon	0,55	37,70
R19	NN	0,92	133,5	AL18	Terpinolen	0,62	47,70
R20	p-Cymol (Monomer)	0,58	22,8	AL19	Acetylmethylcarbiol	0,53	6,80
R21	NN	0,73	8,4	AL20	NN	0,80	3,20
R22	4-Heptanon	0,78	15,3	AL21	Heptanal	0,67	10,10
R23	3-Hydroxy-2-Butanon	0,65	5,9	AL22	NN	0,91	2,90
R24	Iso-propylamin	0,59	3,1	AL23	NN	0,94	3,10
R25	2-Propanol	0,53	2,6	AL24	Phenylacetaldehyd	0,74	29,70
R26	2-Pentanon (Dimer)	0,56	2,0	AL25	NN	0,63	16,30
R27	Butanal	0,63	7,9	AL26	NN	0,79	7,80
R28	Cyclohexanon (Dimer)	0,71	5,4	AL27	1-Pentanol	0,62	7,00
R29	NN	0,85	231,3	AL28	Cyclohexanol (Dimer)	0,77	11,60
R30	NN	0,95	287,7	AL29	NN	0,61	21,30
R31	NN	0,98	424,6	AL30	NN	0,62	21,30
R32	NN	0,99	536,3	AL31	3-Caren	0,65	26,40
R33	NN	0,98	568,0	AL32	D-Limonen	0,60	29,40
R34	Cyclohexanon (Monomer)	0,76	11,2	AL33	NN	0,58	38,10
R35	NN	0,70	16,0	AL34	NN	0,60	29,40
				AL35	NN	0,56	52,30
				AL36	Decanal	0,77	121,80
				AL37	NN	0,54	60,80

Tabelle 5: Atemluftprofil der gesunden Sprague-Dawley® Ratte. Die Signale R01-R35 sind VOCs, die sowohl während der Messung des Beatmungssystems als auch bei einstündiger Messung des beatmeten Versuchstieres detektiert wurden. Demnach wurden diese Signale dem Respirator zugeordnet. Die Signale AL0-AL37 konnten nur während der Messung an der beatmeten Ratte detektiert werden und konnten dementsprechend dem Atemluftprofil der Ratte zugeschrieben werden. R: Respirator; NN: No Name / unbekannte VOCs; AL: Atemluft; 1/K0: Reduzierte Ionenmobilität \triangleq Driftzeit, K0: [cm²/Vs]. RT: Retentionszeit in [s].

6.2. Inflammation nach Injektion von TNF- α

6.2.1. Blutgasanalyse und Herzzeitvolumen

Zu Beginn des Versuchs glichen sich die gemessenen Blutgasparameter und das Herzzeitvolumen in allen Untersuchungsgruppen. In den Blutgasanalysen, die alle 4 h durchgeführt wurden, zeigten sich bei der Kontrollgruppe über den gesamten Zeitraum für die Werte pH, Laktat, pO₂ und pCO₂ keine relevanten Veränderungen. Die Beatmungsparameter pO₂ und pCO₂ hielten sich auch in beiden Inflammationsgruppen die ganze Zeit über auf einem stabilen Niveau. In der Hochdosis-Gruppe stieg die arterielle Laktatkonzentration signifikant gegenüber der Kontrolle und dem Ausgangswert an. Der Basenüberschuss (base excess, BE) ein Parameter des Säure-Basen-Haushalts, fiel während des Untersuchungszeitraums in allen Untersuchungsgruppen ab. In beiden Inflammationsgruppen war dieser Abfall signifikant im Vergleich zu dem jeweiligen Ausgangswert. Der pH blieb in beiden Inflammationsgruppen konstant, nur zu Versuchsende fiel der pH der Niedrigdosis-Gruppe signifikant ab. Das HZV verzeichneten in der Kontrollgruppe geringfügige Änderungen über den Versuchszeitraum. In beiden Inflammationsgruppen stieg das HZV signifikant gegenüber den Ausgangswerten an (*Tabelle 6*).

	0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h
Überlebensrate							
Kontrolle	10	10	10	10	10	10	10
TNF-α 200	10	10	10	9	8	8	8
TNF-α 600	10	10	10	10	10	9	8
pH							
Kontrolle	7,43 ± 0,05	7,46 ± 0,03	7,48 ± 0,03	7,46 ± 0,04	7,47 ± 0,02	7,46 ± 0,04	7,40 ± 0,05
TNF-α 200	7,43 ± 0,03	7,43 ± 0,08	7,44 ± 0,06	7,36 ± 0,10	7,39 ± 0,06	7,39 ± 0,06	7,26*# ± 0,10
TNF-α 600	7,43 ± 0,04	7,48 ± 0,04	7,44 ± 0,05	7,41 ± 0,06	7,41 ± 0,09	7,44 ± 0,09	7,37 ± 0,09
BE							
Kontrolle	1,7 ± 1,8	-0,6 ± 2,1	-0,2 ± 1,2	1,6 ± 1,8	-1,2 ± 1,8	-2,0 ± 2,3	-2,3 ± 2,0
TNF-α 200	1,0 ± 2,4	-1,7 ± 2,7	-7,4*# ± 3,7	-6,8*# ± 6,4	-5,8*# ± 4,1	-7,2*# ± 4,1	-8,0*# ± 4,9
TNF-α 600	1,0 ± 1,9	0,1 ± 1,8	-5,6*# ± 3,6	-5,5*# ± 3,2	-8,3*# ± 3,7	-7,6*# ± 4,0	-6,2*# ± 4,2
Laktat [mmol/l]							
Kontrolle	0,9 ± 0,3	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2	1,3 ± 0,9
TNF-α 200	0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,4	1,3 ± 0,5	1,5 ± 0,5	1,3 ± 0,3	1,3 ± 0,3	1,6 ± 0,3
TNF-α 600	0,7 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,6 ± 0,5	2,0*# ± 0,5	1,9*# ± 0,4	1,9*# ± 0,6	2,3*# ± 1,0
pO₂ [mmHg]							
Kontrolle	83,6 ± 12,8	85,7 ± 11,5	97,9 ± 16,4	84,9 ± 10,8	94,1 ± 15,3	87,5 ± 15,5	84,8 ± 17,0
TNF-α 200	96,8 ± 2,4	96,4 ± 2,7	111 ± 3,7	103 ± 6,4	108 ± 4,1	107 ± 4,1	78,4 ± 4,9
TNF-α 600	84,3 ± 1,9	96,9 ± 1,8	110 ± 3,6	106 ± 3,2	115 ± 3,7	97,0 ± 4,0	90,0 ± 4,2
pCO₂ [mmHg]							
Kontrolle	40,4 ± 7,3	32,7 ± 2,8	31,6 ± 3,3	35,3 ± 4,4	31,1 ± 3,1	30,7 ± 3,7	37,6 ± 4,0
TNF-α 200	36,0 ± 4,6	35,3 ± 9,4	25,2 ± 3,8	31,8 ± 5,0	29,7 ± 4,2	27,5 ± 4,5	39,8 ± 11,5
TNF-α 600	36,2 ± 5,8	32,2 ± 3,9	27,0 ± 4,8	28,5 ± 3,7	28,5 ± 5,0	27,5 ± 3,2	31,8 ± 7,3
Herzzeitvolumen [ml/min]							
Kontrolle	92,3 ± 16,3	102 ± 31,1	105 ± 40,4	97,7 ± 14,9	106 ± 23,6	136 ± 52,9	167 ± 66,5
TNF-α 200	82,6 ± 16,2	71,8 ± 13,1	82,8 ± 15,4	98,5 ± 10,1	131 ± 31,4	134 ± 15,5	140*# ± 17,1
TNF-α 600	82,8 ± 9,6	85,2 ± 20,1	76,9 ± 20,2	104 ± 29,3	108 ± 25,7	111 ± 29,8	139*# ± 22,3

Tabelle 6: Blutgasanalyse und Herzzeitvolumen nach TNF-α-Gabe. Kontrolle: keine Studienmedikation, nur Basisinfusion mit 5 % Glucose; TNF-α 200: 200 µg/kgKG TNF-α, TNF-α 600: 600 µg/kgKG TNF-α, * p<0,05 vs. Kontrolle, # p<0,05 vs. 0 h. BE: Basenüberschuss, pO₂: Sauerstoffpartialdruck, pCO₂: Kohlenstoffdioxidpartialdruck. Darstellung: Mittelwert ± 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts.

6.2.2. Atemluftprofil

Die Untersuchung der volatilen Biomarker in der Ausatemluft ergab zu Beginn der Untersuchung keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Nach Applikation des pro-inflammatorischen TNF-α zeigten vier VOCs eine signifikante Veränderung ihrer Signalintensität im Vergleich zu Kontrolltieren: 1-Butanol, 1-Pentanol, 3-Pentanon und p-Cymol (*Tabelle 7*).

	0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h
Überlebensrate							
Kontrolle	10	10	10	10	10	10	10
TNF- α 200	10	10	10	9	8	8	8
TNF- α 600	10	10	10	10	10	9	8
1-Butanol [mV]							
Kontrolle	10,8 \pm 5,3	7,3 \pm 3,1	6,8 \pm 2,3	6,5 \pm 2,5	6,6 \pm 2,3	6,6 \pm 2,0	8,1 \pm 2,0
TNF- α 200	9,9 \pm 2,3	6,2 \pm 1,7	5,5 \pm 1,1	6,3 \pm 1,5	7,2 \pm 0,8	11,1 \pm 0,9	11,8 \pm 1,0
TNF- α 600	10,8 \pm 2,7	9,0 \pm 2,7	7,5 \pm 2,5	8,1 \pm 2,1	10,2 \pm 2,6	14,3* \pm 2,1	13,6* \pm 2,4
1-Pentanol [mV]							
Kontrolle	26,9 \pm 12,1	23,8 \pm 12,5	27,1 \pm 11,3	27,8 \pm 19,2	28,3 \pm 20,8	30,4 \pm 23,9	29,4 \pm 22,4
TNF- α 200	42,2 \pm 13,5	36,2 \pm 11,4	29,4 \pm 12,7	34,8 \pm 17,6	47,5 \pm 12,4	78,6*# \pm 11,5	86,7*# \pm 13,8
TNF- α 600	37,9 \pm 7,0	34,9 \pm 5,7	27,6 \pm 7,4	34,5 \pm 8,2	51,6 \pm 10,2	75,4*# \pm 10,9	78,4*# \pm 11,6
3-Pentanon [mV]							
Kontrolle	230,8 \pm 91,6	129,6# \pm 46,5	68,0# \pm 16,0	51,5# \pm 9,9	56,0# \pm 10,0	70,8# \pm 11,7	82,8# \pm 25,0
TNF- α 200	696,2* \pm 67,8	455,0*# \pm 108,3	169,2# \pm 74,6	159,6# \pm 68,1	191,3# \pm 69,8	297,2*# \pm 95,9	420,6*# \pm 120,8
TNF- α 600	753,3* \pm 45,1	518,0*# \pm 84,5	128,1# \pm 20,8	118,1# \pm 31,1	188,0*# \pm 50,7	240,2*# \pm 74,6	394,5*# \pm 109,2
p-Cymol [mV]							
Kontrolle	5,2 \pm 1,2	3,8 \pm 0,9	3,5 \pm 0,9	3,4 \pm 0,9	3,3 \pm 0,9	3,2 \pm 0,7	3,6 \pm 0,8
TNF- α 200	5,1 \pm 1,9	4,5 \pm 3,0	4,6 \pm 2,6	4,3 \pm 2,5	4,1 \pm 2,4	4,6 \pm 2,2	4,7 \pm 2,1
TNF- α 600	7,3 \pm 3,0	10,0*§ \pm 4,5	9,5*§ \pm 4,7	9,1*§ \pm 4,9	9,6*§ \pm 4,6	9,0*§ \pm 4,4	10,1*§ \pm 4,2

Tabelle 7: Atemluftsignale nach TNF- α -Gabe. Die Tabelle zeigt die gemessenen Werte der signifikanten Peaks nach TNF- α -Gabe im Vergleich zu diesen Signalen in der Kontrollgruppe. TNF- α 200: 200 μ g/kgKG TNF α , TNF- α 600: 600 μ g/kgKG TNF α , *: p<0,05 vs. Kontrolle, #: p<0,05 vs. korrespondierender Ausgangswert, §: p<0,05 vs. TNF- α 200. VOC: Volatile Organic Compound, mV: Millivolt. Darstellung: Mittelwert \pm 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts.

Die 1-Butanol-Werte der Kontrollgruppe zeigten einen Intensitätsverlust eine Stunde nach Messbeginn bis zum Zeitpunkt 12 h und blieben danach stabil. Über die ersten 2 h nach TNF- α -Gabe blieb die Signalintensität von 1-Butanol in beiden Inflammationsgruppen auf einem gleichbleibendem Niveau (*Abbildung 10*). Erst danach fielen die Werte ab. Die Niedrigdosis-Gruppe erreichte nach 7 h die geringste Intensität, während in der Hochdosis-Gruppe nach etwa 9 h die niedrigste Intensität detektiert wurde. Die Änderungen der beiden Gruppen waren gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant. Anschließend stieg 1-Butanol in beiden Gruppen an, sodass die Signalintensität in der Hochdosis-Gruppe nach 20 h signifikant gegenüber der Kontrolle gesteigert war. Die Signalintensität von 1-Pentanol in der Kontrollgruppe war für die gesamten 24 h auf einem stabil-niedrigen Niveau. Die gemessenen Werte für 1-Pentanol in den beiden Inflammationsgruppen waren während des gesamten Versuchsverlaufs vergleichbar und zeigten bereits zum Versuchsbeginn im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht erhöhte Werte.

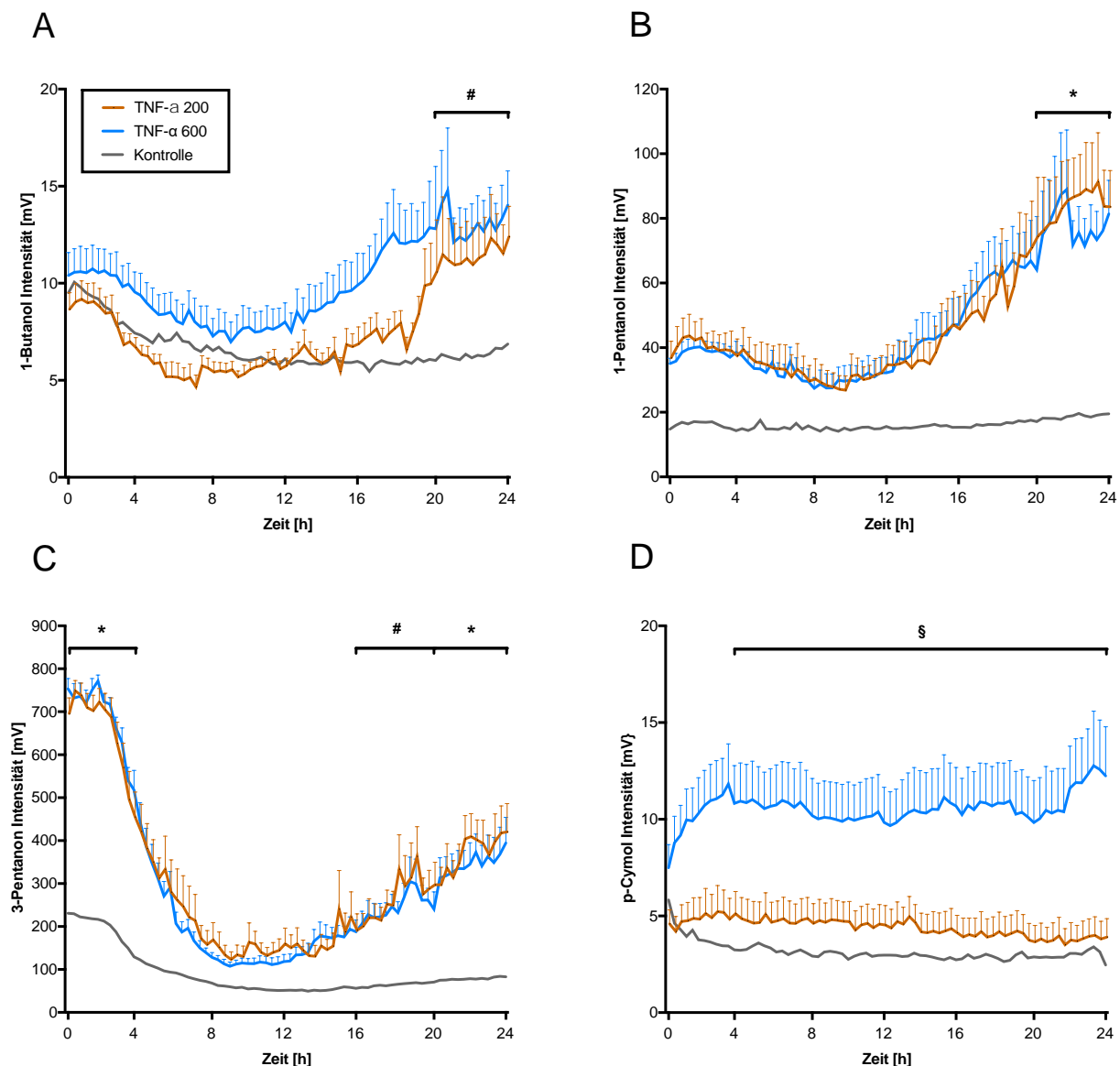


Abbildung 10: Signalintensitäten der signifikanten Peaks nach Induktion einer systemischen Inflammation durch Applikation von TNF- α . A: Verlauf des Signals 1-Butanol über den Versuchszeitraum von 24h bei der Kontrollgruppe und den beiden Inflammationsgruppen. B: Verlauf von 1-Pentanol über 24h. C: Verlauf von 3-Pentanon über 24h. D: Verlauf von p-Cymol über 24h. Kontrolle: Vehikellösung und Basisinfusion mit 5 % Glucose; TNF- α 200: Gabe von 200 $\mu\text{g/kgKG}$ TNF α ; TNF- α 600: Gabe von 600 $\mu\text{g/kgKG}$ TNF α . #: $p < 0,05$ TNF- α 600 vs. Kontrolle; *: $p < 0,05$ beide Inflammationsgruppen vs. Kontrolle; §: $p < 0,05$ TNF- α 600 vs. TNF- α 200 und Kontrolle. Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts.

In den ersten beiden Stunden der Beatmung stiegen die 1-Pentanol-Intensitäten der Inflammationsgruppen leicht an und fielen daraufhin bis 9 h nach TNF- α -Gabe ab. Anschließend stiegen die Signalintensitäten und erreichten 20 h nach Versuchsbeginn in beiden Inflammationsgruppen signifikant höhere Werte im Vergleich zu der Kontrollgruppe und dem korrespondierenden Ausgangswert.

Die Werte der Kontrollgruppe für 3-Pentanon fielen über die ersten 8 h des Versuchs stetig ab und erreichten danach ein konstantes Niveau. In den Inflammationsgruppen blieben die gemessenen Werte für 3-Pentanon über die ersten beiden Stunden auf einem hoch-stabilen Niveau. Im Anschluss fielen die hohen Ausgangswerte bis zum Zeitpunkt 9 h nach TNF- α -Gabe ab. Nach einem dreistündigen Plateau mit niedrigen Signalintensitäten stieg 3-Pentanon in beiden TNF- α -Gruppen an und war nach 16 h in der Hochdosis-Gruppe und nach 20 h in beiden Inflammationsgruppen signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht.

Die p-Cymol Intensität der Kontrollgruppe fiel bis 4 h nach Beginn der Atemluftmessungen ab und verzeichnete ab diesem Zeitpunkt stabile Werte. P-Cymol zeigte in der Hochdosis-Gruppe signifikant höhere Werte ab dem Zeitpunkt 4 h im Vergleich zu der Kontrollgruppe und der Niedrigdosis-Gruppe. Die Niedrigdosis-Gruppe blieb mit den p-Cymol Intensitäten auf einem stabilen Niveau und unterschied sich über den gesamten Versuchszeitraum nur minimal von der Kontrollgruppe.

6.2.3. Überlebenszeit

Alle Tiere der Kontrollgruppe überlebten den Versuchszeitraum von 24 h. Die TNF- α -Gruppe, der 200 μ g/kgKG verabreicht wurde, überlebte im Mittel 21,6 h. Die Versuchsgruppe mit höherdosierter TNF- α -Applikation hatte eine mittlere Überlebenszeit von 22,8 h. Dieser Unterschied zwischen den Gruppen war nicht signifikant.

6.2.4. Vitalparameter

Die hämodynamischen Parameter blieben in der Kontrollgruppe den gesamten Untersuchungszeitraum von 24 h über stabil. Ausgangswert war in allen drei Versuchsgruppen ein MAP von ca. 100 mmHg. In beiden Inflammationsgruppen fiel 12 h nach Versuchsbeginn der MAP signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe ab. Die Kontrollgruppe verzeichnete 12 h nach Versuchsbeginn einen Mittelwert des MAPs von 97 mmHg (95%-Konfidenzintervall \pm 10). Die Niedrigdosis-Gruppe wies als MAP-

Mittelwert 78 mmHg (95%-Konfidenzintervall ± 13) und die Hochdosis-Gruppe einen Mittelwert von 68 mmHg (95%-Konfidenzintervall ± 11) auf.

Sowohl in der Hochdosis- als auch in der Niedrigdosis-Gruppe waren die Werte des MAPs gegen Ende auf ca. 50 mmHg gesunken (*Abbildung 11*). Eine Intervention mit hämodynamisch wirksamen Substanzen erfolgte zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung.

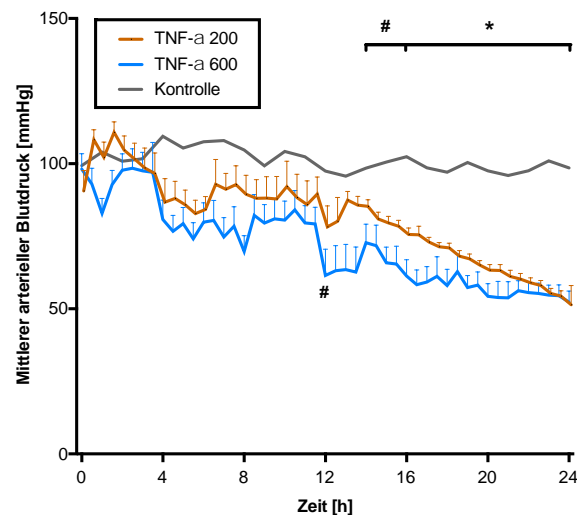


Abbildung 11: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) über den Versuchszeitraum von 24h. Mittlerer arterieller Blutdruck; Kontrolle: Vehikellösung und Basisinfusion mit 5 % Glucose; TNF- α 200: Inflammationsgruppe, der 200 $\mu\text{g/kgKG}$ TNF- α appliziert wurde; TNF- α 600: Inflammationsgruppe, der 600 $\mu\text{g/kgKG}$ TNF- α appliziert wurde. *: $p < 0,05$ beide Inflammationsgruppen vs. Kontrolle; #: $p < 0,05$ TNF- α 600 vs. Kontrolle. Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts.

6.2.5. Zytokinkonzentration

Zu Versuchsbeginn sowie nach 12 h wurde den Versuchstieren 0,5 ml Blut zur Zytokinbestimmung abgenommen. Dabei konnte für die Zytokine IL-6 und IL-10 Unterschiede zur Kontrollgruppe ausgemacht werden.

IL-6 stieg sowohl in der Niedrigdosis-Gruppe als auch in der Hochdosis-Gruppe in den ersten 12 h an. In der Kontrollgruppe blieb die IL-6-Konzentration über den gesamten Untersuchungszeitraum annähernd stabil (*Abbildung 12, A*). IL-10 zeigte in der Niedrigdosis-Gruppe nur einen minimalen Anstieg in den ersten 12 h nach Versuchsbeginn. In der Hochdosis-Gruppe war IL-10 zu Beginn nur in basalen Konzentrationen messbar. Nach 12 h hingegen konnten in dieser Gruppe die höchsten

Werte für IL-10 gemessen werden. In der Kontrollgruppe blieben die Werte für IL-10 auf einem leicht abfallenden niedrigen Niveau (*Abbildung 12, B*).

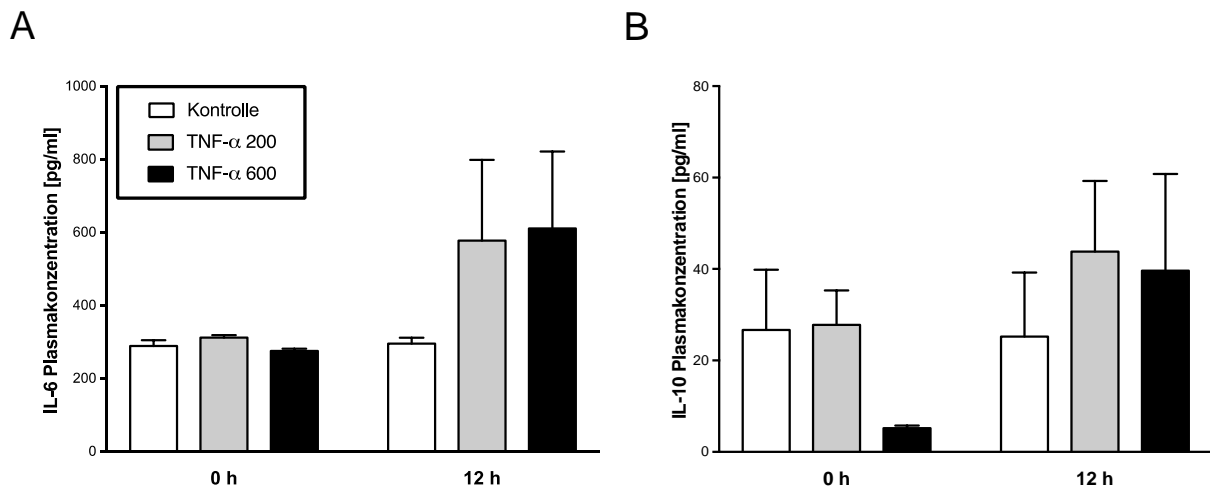


Abbildung 12: IL-6- und IL-10-Plasmakonzentrationen nach TNF- α -Gabe. A: IL-6 Plasmakonzentrationen zu Versuchsbeginn und nach 12 h. B: IL-10 Plasmakonzentrationen zu Versuchsbeginn und nach 12 h. Daten werden als Mittelwert \pm SD dargestellt. $p < 0,05$. Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts.

6.3. HovaCal[®]-Messung

Die Messung des Medikaments Tasonermin, ein rekombinanter TNF- α , erfolgte mit dem HovaCal[®]. Dabei wurde das Medikament bei 100 °C verdampft und anschließend die Signale mittels IMS gemessen. Hierbei konnte keine Übereinstimmung mit den Messungen der Ausatemluft der Ratten während der Inflammation festgestellt werden (*Abbildung 13*).

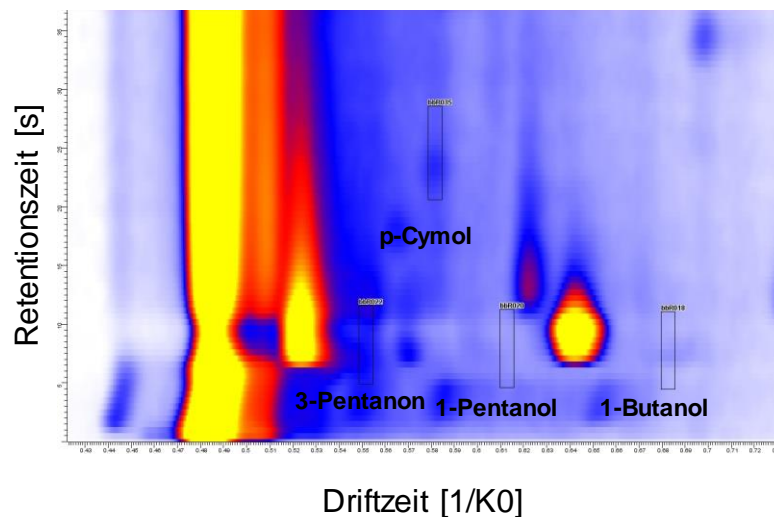


Abbildung 13: Chromatogramm der HovaCal®-Messung der TNF- α -Lösung. Ebenfalls mit in die Abbildung aufgenommen sind die signifikanten Peaks der Tierrmessungen 1-Butanol, 1-Pentanol, 3-Pentanon und p-Cymol. Es ist zu erkennen, dass die Signale der Tierrmessung nicht mit der HovaCal®-Messung der TNF- α -Lösung korrelieren. 1/K0: Reduzierte Ionenmobilität, K0: [cm²/Vs].

6.4. Atemluftprofil der Patientin

Die Untersuchung der Atemluft mittels IMS während einer isolierten Extremitätenperfusion mit TNF- α erfolgte im Zuge der Therapie bei malignem Melanom. Diese Untersuchung ermöglichte den Vergleich des Exhaloms zwischen Rattenmodell und einer Messung am Menschen. Die Messung der Atemluft mittels IMS begann perioperativ, 3,5 h nach Beginn der IMS-Messung erfolgte die TNF- α Gabe. Die Ausatemluft der Patientin wurde insgesamt über einen Zeitraum von 6 h gemessen. Hierbei gelang die Detektion der vier VOCs 1-Butanol, 1-Pentanol, 3-Pentanon und p-Cymol in der Atemluft der Patientin. Den Verlauf der Signale zeigt Abbildung 14. 1-Butanol und 1-Pentanol zeigten über den gesamten Untersuchungszeitraum auffallend ähnliche Intensitäten. Nach Gabe der TNF- α -Studienmedikation stiegen beide VOCs bis auf 80 mV an. 1-Butanol und 1-Pentanol hielten sich nach Medikamenten-Gabe für 1,5 h auf einem hohen Niveau und fielen gegen Ende der Atemluftmessungen (2 h nach TNF- α -Gabe) leicht ab. Die Signalintensitäten von 3-Pentanon stiegen ab Beginn der Atemluftmessung leicht an. Die TNF- α -Gabe zeigte keinen zeitnahen Einfluss auf 3-Pentanon, jedoch konnte 2 h nach Gabe eine abfallende Tendenz der Intensitäten erkannt werden. Die Signalintensitäten von p-Cymol waren über den gesamten Zeitraum der Untersuchung

annähernd konstant mit leicht erhöhten Werten gegen Ende der Atemluftanalyse (Abbildung 14).

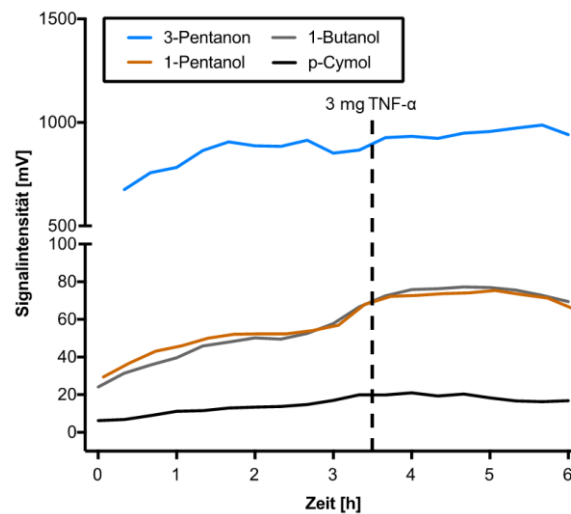


Abbildung 14: Signalintensitäten von 1-Butanol, 1-Pentanol, 3-Pentanon und p-Cymol nach isolierter Extremitätenperfusion mittels Injektion von TNF- α . Nach 3,5h Atemluftanalyse erfolgte die TNF- α -Gabe.

6.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die Veränderungen von VOCs in der Ausatemluft während TNF- α induzierter systemischer Inflammation mittels IMS im Tiermodell untersucht. In diesem Zusammenhang wurde diese Messung erstmals an einem Patienten bei isolierter TNF- α Extremitätenperfusion angewandt und mit den erhobenen tierexperimentellen Daten verglichen.

Aus der vorliegenden Fragestellung wurden folgende Erkenntnisse gewonnen:

1. Es gibt signifikante Unterschiede im Atemluftprofil von gesunden Ratten und Ratten nach Induktion einer systemischen Inflammation. Nach Applikation des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α zeigten vier VOCs eine signifikante Veränderung ihrer Signalintensität im Vergleich zu Kontrolltieren: 1-Butanol, 1-Pentanol, 3-Pentanon und p-Cymol.
2. Eine Dosisabhängigkeit der Inflammationsgruppen besteht bei den VOCs 1-Butanol, 3-Pentanon und p-Cymol. In der Hochdosis-Gruppe stieg die Intensität

von 1-Butanol und p-Cymol höher als bei der Niedrigdosis-Gruppe. Die Intensität von 3-Pentanon zeigte in der Hochdosisgruppe einen früheren Anstieg als in der Niedrigdosis-Gruppe. Zwischen beiden Inflammationsgruppen ergab sich kein Unterschied für 1-Pentanol.

3. Die Veränderung von volatilen Biomarkern in den Inflammationsgruppen geht mit Änderungen der Vitalparameter, der Überlebenszeit und von pro-inflammatorischen Zytokinen im Blut einher. In beiden Inflammationsgruppen fiel 12 h nach Versuchsbeginn der MAP signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe ab. Das HZV stieg in beiden Inflammationsgruppen signifikant gegenüber den Ausgangswerten an. Beide Inflammationsgruppen zeigten gering kürzere Überlebenszeiten als die Kontrollgruppe. Die Zytokinkonzentrationen der Kontrollgruppe blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum annähernd stabil, wohingegen sich in beiden Inflammationsgruppen moderate Steigerungen der Konzentration von IL-6 und IL-10 zeigten.
4. Die während systemischer Inflammation bei Ratten gemessenen Atemluftsignale sind auch im Atemluftprofil eines Menschen während systemischer Inflammation detektierbar. Es gelang die Messung der vier VOCs 1-Butanol, 1-Pentanol, 3-Pentanon und p-Cymol in der Atemluft einer Patientin.

7. DISKUSSION

7.1. Diskussion von Material und Methoden

7.1.1. *In vivo*-Modell

Zur Charakterisierung der Ausatemluft bei systemischer Inflammation fand in der vorliegenden Arbeit ein Rattenmodell Anwendung. Das Ziel war die Darstellung der Interaktion zwischen messbaren Komponenten des Exhalats und der induzierten Inflammation.

TNF- α fungiert als potenter Mediator der Inflammation durch Vermittlung von pro-inflammatorischen Interaktionen von Entzündungszellen und subzellulären Komponenten [134]. Dementsprechend findet TNF- α eine breite Anwendung zur experimentellen Induktion einer sterilen Inflamationsreaktion. Sowohl die lokale als auch die systemische Anwendung führt in einer Vielzahl von Tiermodellen zur zuverlässigen Modellierung der im menschlichen Körper ablaufenden Entzündungsreaktionen [13, 136]. Diese TNF- α -Modelle wurden in der Vergangenheit vor allem in der rheumatischen, dermalen sowie chirurgischen Forschung genutzt, fanden aber in den letzten Jahren vermehrt Verwendung für anästhesiologisch-intensivmedizinische Fragestellungen [15, 63, 76, 80, 136].

Tatsächlich stehen für die Darstellung der *in vivo*-Antwort auf eine Inflammation heute eine Vielzahl von Modellen zur Verfügung, die mit verschiedenen Endotoxinen oder Zytokinen arbeiten. Ein häufig verwendetes Tiermodell zur Induktion einer sterilen Inflammation ist die Injektion von Lipopolysaccharid (LPS) [20]. Dabei werden ähnliche pro-inflammatorische Komponenten freigesetzt wie bei TNF- α , unter anderem IL-1 und IL-6 [126]. Des Weiteren kann eine Inflammation durch die intraperitoneale Injektion von Thioglykolat ausgelöst werden, bei der Keratinocyte-derived Chemokine, Makrophage Inflammatory Protein-2 und Monocyte Chemoattractant Protein-1 als Mediatoren der Entzündungsreaktion fungieren [66]. Ein alternatives, weniger gebräuchliches *in vivo*-Modell stellt die Injektion des Homoglykans Zymosan dar. Hierbei wird das Komplementsystem im Zuge der angeborenen Immunantwort aktiviert und führt so zu einer Entzündungsreaktion [117]. Interessanterweise scheinen alle drei Stoffe zumindest teilweise agonistisch zu wirken, und TNF- α wird als gemeinsamer

downstream-liegender Mediator von LPS, Thioglykolat und Zymosan induziert [131, 139, 161]. Dementsprechend wird TNF- α sowohl in der bakteriellen als auch in der sterilen Inflammation eine Kernfunktion zuteil [122].

Da TNF- α einen universellen Schlüsselmediator in Entzündungsprozessen von primärer Wichtigkeit darstellt, wurde in der vorliegenden Studie fokussiert dessen Auswirkungen auf volatile Biomarker betrachtet. Ein dosisabhängiger Effekt von TNF- α auf zahlreiche Parameter im Tiermodell, wie beispielsweise metabolische Azidose und Hypotension, wurde in der Vergangenheit publiziert [22, 158]. Entsprechend den Erfahrungen von Tracey *et al.* wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Dosierungen von TNF- α verabreicht. Während eine Versuchsgruppe eine Dosis von 200 $\mu\text{g/kgKG}$ TNF- α erhielt, welche in Studien milde inflammatorische Effekte zeigte, wurde der zweiten Gruppe 600 $\mu\text{g/kgKG}$ TNF- α injiziert. Diese Dosierung erwies sich in vorangegangenen Studien als potenter in der Auslösung einer systemischen Inflammation, ohne in einer zu kurzen Zeit zum Tode der Versuchstiere zu führen [158]. Diverse Spezies sind zur Anwendung in der tierexperimentellen Inflammationsforschung bereits etabliert, darunter Mäuse, Hamster, Schweine und Ratten [76, 110, 162, 178]. Insgesamt sind allerdings Mauslinien die genetisch am besten definierte und folglich wissenschaftlich einer der am meisten verbreiteten Spezies unter den genannten Versuchstieren. Dementsprechend ist ein breites Spektrum an Knockout-Stämmen, transgenen Linien und assoziierten Antikörpern kommerziell erhältlich. Da in dieser Arbeit die Untersuchung der Inflammation mithilfe eines IMS stattfand, wurden Versuchstiere benötigt, an denen kontinuierliche Atemanalysen möglich sind. Mäuse wurden bereits als Versuchstiere zur IMS-Analyse bei Asthma bronchiale verwendet [106, 164]. Dabei atmeten die intubierten Mäuse allerdings spontan, sodass das Tidalvolumen und das ausgeatmete Volumen stark variieren konnten. Gerade in fortgeschrittenen Krankheitsverläufen neigten die Tiere zur Hypoventilation. Dabei wird vorwiegend im Bereich des Totraumvolumens geatmet, was geringere Mengen ausgeatmeter Metabolite und Biomarker zur Folge hat und somit Messungenauigkeiten nach sich ziehen kann. Aus diesem Grund ist es zur standardisierten Atemluftanalyse notwendig, die Versuchstiere kontrolliert zu beatmen. Durch maschinelle Beatmung bei Muskelrelaxation in tiefer Narkose kann das Tidalvolumen auf den Bedarf des Tieres angepasst werden und dadurch größere Schwankungen der Atemfrequenz und des -volumens vermieden werden.

Um Tiere suffizient maschinell beatmen zu können, spielt auch die Größe des Versuchstiers eine entscheidende Rolle. Sowohl die Tracheotomie zur Intubation als auch die Anlage der Gefäßzugänge und die Überprüfung von Beatmung und Narkoseführung sind bei Ratten qualitativ hochwertiger zu bewerkstelligen als bei Mäusen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Sprague-Dawley® Ratte ist eine häufig verwendete Tierlinie in experimentellen Versuchsaufbauten. Biologische sowie umweltbedingte Störfaktoren konnten durch Anwendung genetisch identischer Tiere unter standardisierter Haltung in der vorliegenden Arbeit auf ein Minimum reduziert werden [185]. Besonders nahrungsbedingte Einflüsse auf den Versuchsaufbau waren zu beachten, da bereits geringe Schwankungen in der Nahrungs- und Flüssigkeitssupplementierung während der IMS-Analyse in vorherigen Studien zu signifikanten Veränderungen der gemessenen VOC-Signale führten [44]. Entsprechend wurden die Tiere 12 h vor Versuchsbeginn einer Nahrungskarenz unterzogen.

7.1.2. Vortrennung durch Multikapillarsäule-Kopplung

Die biologische Atemluftanalyse stellt ein Verfahren dar, das potenziell Rückschlüsse über systemische Vorgänge des Organismus zulässt. Dabei wird das Exhalat möglichst ohne Verunreinigungen direkt aus dem Körper aufgefangen. Diese Probe setzt sich zum einen aus exhalierem Wasserdampf, zum anderen aus dem eigentlichen Analyten zusammen [95]. Ausatemluft weist physiologisch eine hohe Luftfeuchtigkeit auf und kann dadurch die Zusammensetzung sowohl der Reaktions-Ionen als auch der Produktions-Ionen beeinflussen. Mit zunehmend relativer Feuchte bewegen sich die Maxima der Peaks in Richtung größerer Driftzeiten. Eine Erklärung hierfür könnte die Reduktion der Mobilität aufgrund der Entstehung größerer Molekülcluster durch angelagerte Wassermoleküle sein. Allerdings wird die Verlängerung der Driftzeiten bei zunehmender Feuchte schwächer. Dieser Effekt beruht auf dem Verlust von Wassermolekülen der stark hydratisierten Ionen bei Zusammenstößen mit den Driftgasmolekülen und bei der Bewegung durch den Driftraum. Neben den Driftzeiten werden auch die Intensitäten der Peaks durch die Luftfeuchtigkeit der Probe beeinflusst. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass

die Ionen an Größe zunehmen und deshalb an Wänden und am Einlassgitter verbleiben, was eine Detektion verhindert [128]. Durch diese Effekte werden die Detektion der Ionen und die Interpretation von Ausatemluft mittels IMS-Analyse erschwert. Folglich erhöht eine Abtrennung der Wassermoleküle vor dem Eintritt in den Ionisationsraum sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität der Detektionsmethode erheblich [45].

Tatsächlich stehen heute für diese Vortrennung eine Vielzahl von unterschiedlichen koppelbaren Systemen zur Verfügung, die beispielsweise die Permeation des zu analysierenden Stoffes an einer Membran oder gaschromatographische Vortrennungen beinhalten [29, 70, 73]. Ein Problem bei Membraneinlass-Systemen stellt die erhöhte Permeabilität für Wasserdampf bei Druck- und Temperaturerhöhung dar [70]. Bei der gaschromatographischen Vortrennung gelingt die Trennung von Analyten in einem Gasgemisch unter Vakuumeinsatz [74]. Diese Ansätze gehen allerdings mit einer erhöhten Störanfälligkeit, einer limitierten Gruppe analysierbarer Stoffe sowie einer reduzierten Möglichkeit zur Miniaturisierung einher, wodurch ein möglicher translationaler klinischer Einsatz deutlich beschränkt wird.

Demgegenüber bietet die in der vorliegenden Arbeit angewendete Kopplung mit einer isothermen Multikapillarsäule den Vorteil, dass Messungen in einem hohen Molmassenbereich bei geringer Größe durchgeführt werden können. Zusätzlich kann durch die Vortrennung mittels MCC ein weiterer Parameter, die Retentionszeit, zu erhöhter Selektivität und Empfindlichkeit der IMS-Analyse beitragen. Die Retentionszeit beschreibt die Dauer, die ein Analyt für die Passage durch eine Einzelkapillare der insgesamt 1200 Kapillaren benötigt [72]. Unterschiedliche Moleküle haben eine individuelle Passagezeit innerhalb der Säule. Durch die Einbeziehung der Parameter Retentions- und Driftzeit sowie Signalintensität werden somit die hohe Sensibilität als auch die gute Spezifität der VOC-Analyse mittels MCC-IMS gewährleistet. Darüber hinaus ist die MCC gegenüber gaschromatographischen Verfahren durch gesteigerten Luftdurchfluss bei gleicher Trenneffizienz und relativer Resistenz gegenüber internen Störungen charakterisiert [72]. Dadurch ermöglicht sie potenziell die von Maurer *et al.* postulierte Möglichkeit zum Einsatz im klinischen Alltag [95].

7.1.3. Biomarker-Detektion: Ionenmobilitätsspektrometer

Eine breite Auswahl von Detektoren hat in den vergangenen Jahren Einzug in die medizinische Atemluftanalyse gehalten, wobei eine Vielzahl von Anforderungen für den klinischen Einsatz erfüllt werden müssen. Der Probentransport der Atemluft ist nur sehr limitiert möglich, da lange Transportwege zu einem geeigneten laborchemischen Setting zeit- und kostenaufwendig sind und die Fehlerquote drastisch steigern [183, 184]. Bei einer Zeitverzögerung der Atemluftmessung kann sich durch Temperaturschwankungen und den hohen Feuchtigkeitsgehalt die chemische Zusammensetzung des Analyts ändern und so zu Messungenauigkeiten führen. Im Vordergrund stehen demnach praktische Aspekte der patientennahen Anwendung wie Größe, Lautstärke und Widerstandsfähigkeit gegenüber externen Einflussfaktoren, wie sie bereits für die gekoppelten Vortrennungssysteme erwähnt worden sind. Des Weiteren liegen die zu detektierenden Analyt-Ionen in der Luftprobe in Konzentrationen im Spurenbereich zwischen ppbv bis pptv (10^{-9} bis 10^{-12}) vor. Zwar kann die Sensitivität und Spezifität eines jeden Detektors durch Anwendung eines geeigneten Vortrennungsverfahrens stark erhöht werden, doch stellt die Analyse dieses geringen Probenvolumens immer noch eine hohe Anforderung an die Analyseverfahren dar. Darüber hinaus setzen sich die zu messenden Biomarker aus verschiedenen chemischen Einzelsubstanzen zusammen und unterliegen erheblichen physiologischen Konzentrationsschwankungen.

In Abhängigkeit von der Fragestellung finden heute vorrangig Massenspektrometer, Photoionisations- und Flammenionisationsdetektoren Einsatz [54, 71, 142, 148]. Während jede dieser Methoden als Gemeinsamkeit die Analyse ionisierter Biomarker hat, unterscheiden sich die unterschiedlichen Geräte doch in ihren Maßen und verschiedenen Charakteristika.

Um den oben genannten Anforderungen an das Messverfahren möglichst gerecht zu werden, wurde in der vorliegenden Arbeit ein IMS als Analysegerät verwendet, welches kurze Analysezeiten zwischen 1-15 Minuten zur kontinuierlichen Messung mit einer einfachen und kostengünstigen Probeentnahme kombiniert [25, 184]. Außerdem wird im Gegensatz zu massenspektrometrischen Verfahren bei der MCC-IMS kein Vakuum für die Messung benötigt. Daten können daher mit relativ geringem technischem Aufwand zuverlässig erhoben werden [59]. Die Kopplung dieses Gerätes mit einer MCC zur Vortrennung beinhaltet darüber hinaus die klinisch relevante

potentielle Möglichkeit der Miniaturisierung [2]. Zur weiteren Maximierung der Standardisierung wurde sowohl das MCC-IMS als auch das Beatmungsgerät mit synthetischer Luft höchsten Reinheitsgrades betrieben. Zusätzlich wurden nur Beatmungs- und Probeschläuche sowie Konnektoren aus Teflon oder Edelstahl verwendet, um so die Resorption flüchtiger Verbindungen zu minimieren und Störsignale zu vermeiden [3, 185]. Insgesamt konnten so Resultate erzielt werden, die eine Charakterisierung der untersuchten VOCs mit hoher Genauigkeit verlässlich zuließen [72].

7.1.4. Isolierte Extremitätenperfusion

Die isolierte Extremitätenperfusion ist ein Verfahren, welches u.a. bei der Behandlung des malignen Melanoms im Extremitätenbereich angewendet wird, wenn keine R0-Resektion möglich ist [50, 78, 155]. Patienten mit lokoregionalen Hautmetastasen weisen gegenwärtig eine 5-Jahre-Überlebensrate von etwa 25% auf [6]. Die isolierte Extremitätenperfusion kann in diesem Krankheitsstadium zu kompletten oder partiellen Remissionen führen [39, 111]. Allerdings verweist die aktuelle Leitlinie für maligne Melanome darauf, dass der Erfolg der isolierten Extremitätenperfusion stadienabhängig und mit nicht zu unterschätzenden Nebenwirkungen behaftet ist [35, 39, 111]. Diese können aus einem Übergang von TNF- α in den Systemkreislauf resultieren. Bei der untersuchten Patientin wurde ein Übergang von TNF- α in den systemischen Blutkreislauf mithilfe eines Radiotracers belegt. Auf dieser Grundlage wurden anschließend die volatilen Biomarker gemessen. Aufgrund der gravierenden Nebenwirkungen wird das Verfahren der ILP nur in Ausnahmefällen angewendet und ist ausschließlich als individueller Heilversuch möglich [84]. Die in dieser Arbeit behandelte Patientenmessung wurde als Pilotversuch konzipiert, in der getestet werden sollte, ob eine Messung der vorher im Tierexperiment identifizierten volatilen Biomarker nach TNF- α Gabe auch beim Menschen möglich ist.

7.2. Diskussion der Ergebnisse

7.2.1. Tiermessung

7.2.1.1 Atemluftanalyse

Bei den detektierten VOCs sollte zwischen dem Profil einer unbehandelten, gesunden Ratte und dem eines behandelten Versuchstieres während einer Inflammation unterschieden werden. Deshalb wurde zusätzlich zu den Inflamationsgruppen eine unbehandelte Kontrollgruppe untersucht. Das Atemluftprofil der Tiere innerhalb der Kontrollgruppe war durch einen konstanten Verlauf der untersuchten VOCs gekennzeichnet.

Basierend auf diesen Ausgangswerten konnte demonstriert werden, dass sich das Exhalom der inflammatorischen Tiere in einigen VOCs signifikant von der Kontrollgruppe unterschied. Entsprechend spiegelte sich die Gabe des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α im Atemluftprofil mit Veränderungen von vier VOCs wider. Hierzu gehören der Amylalkohol 1-Pentanol sowie der aliphatische Kohlenwasserstoff 1-Butanol, die beide bei Induktion einer systemischen Inflammation mittels TNF- α unabhängig von der Dosierung anstiegen. Außerdem zeigte der aromatische Kohlenwasserstoff p-Cymol nur nach Gabe von hochdosiertem TNF- α eine Steigerung seiner Intensität. Es ist denkbar, dass diese drei VOCs bei der Regulation einer Inflammation eine wichtige Rolle spielen [92]. Allerdings sind die Herkunft und der potenzielle Krankheitswert noch nicht sicher nachvollziehbar und bedarf weiterer Untersuchungen [4, 52, 87, 114]. Es konnte in vorangehenden Studien nachgewiesen werden, dass 1-Butanol die Aktivität der Myeloperoxidase *in vivo* verringert [18]. Myeloperoxidase wird von aktivierten Neutrophilen freigesetzt und besitzt pro-oxidative und pro-inflammatorische Eigenschaften [88]. Außerdem verringert 1-Butanol die Produktion von Stickstoffmonoxid, Prostaglandin E₂, TNF- α und der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-6 *in vitro* [18]. Auch p-Cymol könnte eine Rolle zur Regulation der Entzündungsreaktion spielen [92]. Allerdings wurde es bisher nur im Rahmen von Studien an ätherischen Ölen und deren antimikrobieller Aktivität untersucht [92]. 3-Pentanon hingegen scheint, wie bereits beschrieben, eher ein Produkt des Metabolismus bei Entzündungsreaktionen ohne eigene inflammatorische Aktivität zu sein [76].

Das Keton 3-Pentanon zeigte in allen Versuchsgruppen zu Beginn einen Abfall. Sowohl bei der Hochdosis-Gruppe als auch bei der Niedrigdosis-Gruppe folgte nach 16 h ein signifikanter Anstieg von 3-Pentanon im Exhalom gegenüber der Kontrollgruppe. Den Zusammenhang zwischen detektierten Atemluftsignalen und pathologischen Veränderungen im Organismus zu bilden, stellt eine der Hauptaufgaben dar, um die VOC-Analyse zur klinisch relevanten Diagnostik zu nutzen. Dabei ist der organische Ursprung der gemessenen Signale wichtig, um den Stoffwechsel des Analyts zu verstehen. Eine mögliche Erklärung für die Herkunft von 3-Pentanon basiert auf der Erkenntnis, dass es während Inflammationsvorgängen im Körper aufgrund eines metabolischen Ungleichgewichts zu Nährstoff- und Energiemangel, dem sog. Aggressionsstoffwechsel, kommen kann. In der katabolen Phase im Rahmen einer Entzündung werden Muskelproteine abgebaut, um so essentielle Aminosäuren bereitzustellen. Diese Aminosäuren sind zur Herstellung dringend notwendiger Proteine wie Akute-Phase-Proteine in der Leber erforderlich. So kommt es dazu, dass verzweigtkettige Aminosäuren (branched chain amino acid = BCAA) und die dazugehörigen Ketocarbonsäuren (branched chain keto acid = BCKA) generiert und in die Blutzirkulation freigesetzt werden. Zur Bereitstellung dieser Aminosäuren könnte eine gesteigerte Oxidation von verzweigtkettigen Ketocarbonsäuren in der Leber mit daraus resultierender Anhäufung von Propionyl-CoA und seinen Kondensationsprodukten, zu denen 3-Pentanon gehört, notwendig sein (*Abbildung 15*) [76]. Außerdem werden während einer Inflammation im Körper die BCAA- und BCKA-Transporter exprimiert, sodass eine Wiederaufnahme in die Leber gegenüber der Resorption in Muskelmasse favorisiert wird [94]. Schon frühere Studien beschrieben den Zusammenhang von Sepsis und Inflammation mit dem BCKA-Metabolismus [93, 97, 159]. Hierbei wurden die Erbkrankheiten Propionazidämie und Methylmalonazidurie untersucht, bei denen es aufgrund eines Enzymdefekts zur Inhibierung des physiologischen oxidativen BCKA-Abbaus kommt. Dadurch kommt es bei diesen Krankheitsbildern zur Anhäufung von Propionyl-CoA und weiteren Substanzen, die sich vom Propionyl-CoA ableiten, was die Erhöhung von 3-Pentanon erklären könnte [83].

Um diese Hypothese zu bekräftigen, untersuchten Kleber *et al.* Lebergewebe von Ratten 24 h nach TNF- α Applikation [76]. Dabei fanden sich eine gesteigerte Expression von verzweigtkettiger Ketocarbonsäuren-Dehydrogenase (BCKD), eine niedrigere Expression der Propionyl-CoA Carboxylase (PCCA und PCCB) und

Veränderungen der Expression von Dehydrogenase-regulierenden Enzymen. Daher scheint die Verstoffwechselung von Propionyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA bei TNF- α -induzierter systemischer Inflammation gemindert zu sein, was eine vermehrte Umwandlung von Propionyl-CoA zu Kondensationsprodukten zur Folge hat (*Abbildung 15*). Die BCKD-Kinase (BCKDK) inaktiviert die Aktivität der BCKD durch Phosphorylierung. Die Phosphatase PPM1K ist verantwortlich für die Dephosphorylierung und Aktivierung der BCKD [33, 62]. Kleber *et al.* fand in den TNF- α -Gruppen eine verminderte Phosphorylierung der BCKD, was eine erhöhte PPM1K- und eine erniedrigte BCKDK-Aktivität vermuten lässt [76].

Die beobachteten Transkriptionsniveaus zeigten allerdings genau das entgegengesetzte Muster. Es ist jedoch nicht ungewöhnlich, dass Diskrepanzen zwischen Transkriptions-Menge und Enzym-Aktivität auftreten, da die Enzym-Produktion durch posttranskriptionale und posttranslationale Regulation modifiziert wird. In Übereinstimmung mit einem solchen Mechanismus wird beispielsweise die BCKDK-Aktivität durch α -Ketoisocaproat, ein BCKA, welches bei der Leucin-Transaminierung entsteht, inhibiert. Dieser Mechanismus ist bei der kurzfristigen Regulierung des BCKD-Komplexes von Bedeutung [16, 61]. Hohe Plasmakonzentrationen von BCKA blockieren somit die BCKDK-Aktivität, wodurch die Dephosphorylierung durch PPM1K ermöglicht wird. Die Dephosphorylierung der BCKD steigert die Aktivität dieser und löst die irreversible oxidative Decarboxylierung der BCKA aus. Auf diesem Weg könnten überschüssige BCKA aus dem Organismus entfernt werden, die bei Inflammation durch gesteigerte Proteolyse anfallen. Außerdem stellen die Substrate eine Energiequelle für Zellen dar. Harris *et al.* beschrieb den Effekt von Kalorien- und Proteinmangel auf die Aktivitäten der BCKD und der BCKDK [61]. Kalorienmangel verringert die BCKDK-Aktivität und erhöht die BCKD-Aktivität, während Proteinmangel genau das Gegenteil bewirkt.

Entsprechend diesem Kreislauf suggeriert die hohe Konzentration von 3-Pentanon in den ersten 2 h der Messungen in der vorliegenden Arbeit hohe BCKD-Aktivität, vermutlich aufgrund eines Kalorienmangels im Rahmen eines Aggressionsstoffwechsels. Geringe 3-Pentanon-Konzentrationen während den darauffolgenden Stunden sprechen für eine erhöhte BCKDK-Aktivität, welche wiederum die BCKD-Aktivität erniedrigt. Dies könnte eine Adaptation zur Verbesserung der Synthese von wichtigen Proteinen in der Leber, wie Akute-Phase-Proteine, sein.

Das Muster von 3-Pentanon während der frühen Inflammation lässt darauf schließen, dass verzweigtkettige Ketocarbonsäuren für die Synthese von neuen Proteinen wiederverwendet werden und nicht über die BCKD den oxidativen, katabolen Reaktionsweg einschlagen.

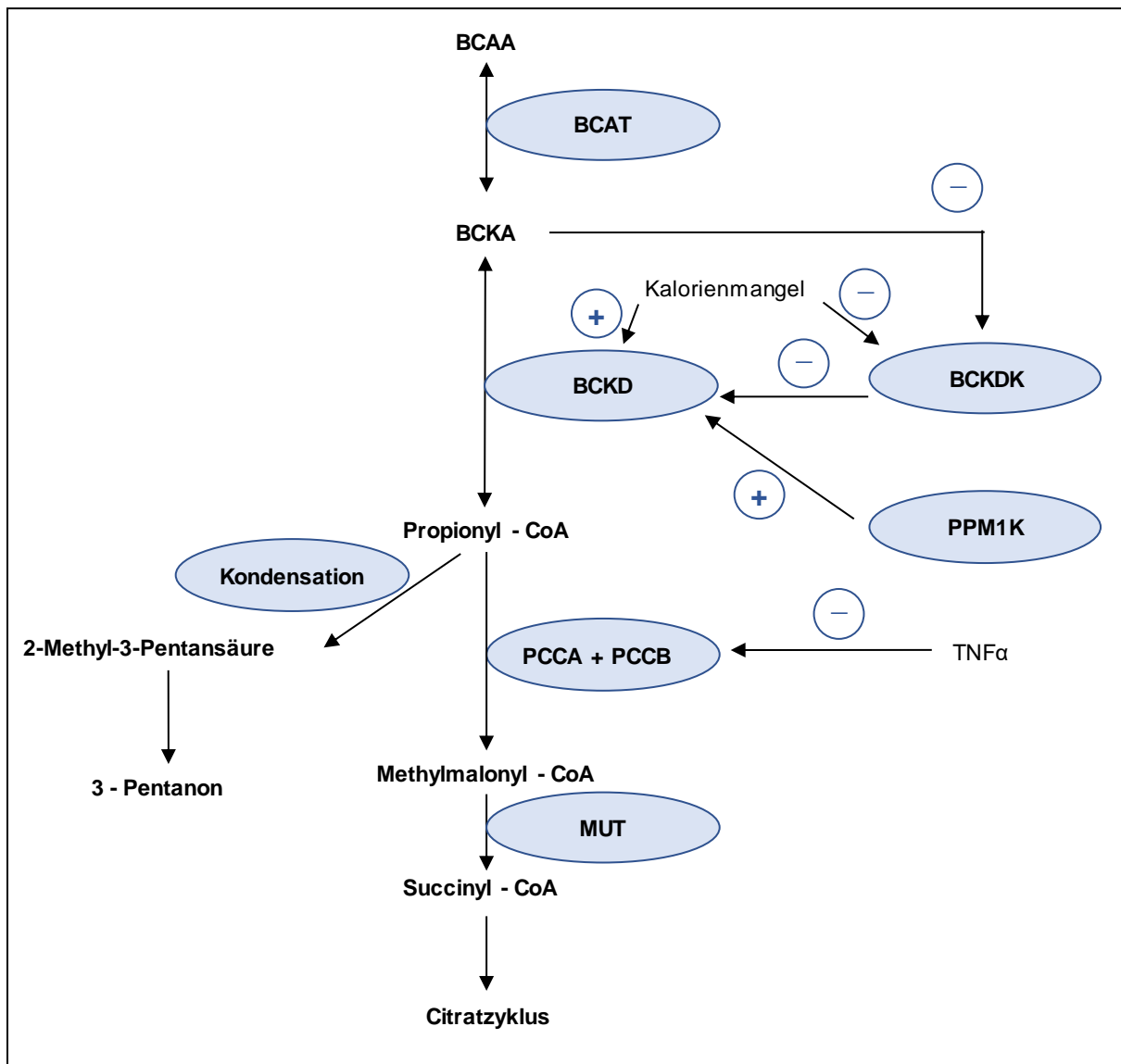


Abbildung 15: Entstehung von 3-Pentanon im BCKA-Metabolismus. Der Abbau von verzweigtkettigen Aminosäuren verläuft über Propionyl-CoA entweder zurück in den Citratzyklus oder nach Kondensation zu 3-Pentanon und weiteren Substraten. Während der Inflammation wird letzterer Weg bevorzugt eingeschlagen. Pfeil mit 2 Spitzen = reversible Reaktion; Pfeil mit einer Spitze = irreversible Reaktion; BCAA = branched-chain amino acid (verzweigtkettige Aminosäuren), BCAT = branched-chain aminotransferase (verzweigtkettige Aminotransferase), BCKA = branched-chain keto acid (verzweigtkettige Ketocarbonsäuren), BCKD = branched-chain keto acid dehydrogenase (verzweigtkettige Ketocarbonsäuren-Dehydrogenase), BCKDK = branched-chain keto acid dehydrogenase kinase (verzweigtkettige Ketocarbonsäuren-Dehydrogenase-Kinase), PPM1K = Phosphatase, PCCA = Propionyl-CoA-Carboxylase (alpha-Kette), PCCB = Propionyl-CoA-Carboxylase (beta-Kette), MUT = Methylmalonyl-CoA-Mutase. Modifiziert nach [76].

Dies erklärt den Abfall des gemessenen Ketons 3-Pentanon zu Beginn der Inflammation. Bei langanhaltender Inflammation werden Substrate zur Energieversorgung der Zellen erforderlich. Deshalb wird vermutlich der irreversible Abbau (BCKA Oxidation) von überschüssigen BCKA zu Propionyl-CoA aktiviert, was dann wiederum zu einem erhöhten 3-Pentanon in den Inflammationsgruppen führt.

7.2.1.2. Zytokinbestimmung

Die Plasmakonzentrationen von IL-6 und IL-10 wiesen in der Kontrollgruppe annähernd stabile Werte auf. In beiden Inflammationsgruppen stieg die Konzentration beider Zytokine erwartungsgemäß an.

In anderen Tierstudien wurde bereits gezeigt, dass TNF- α die Sekretion von IL-6 induziert, was mit unseren Messungen korreliert [151, 187]. Es ist bekannt, dass IL-6 eine wichtige Rolle bei der Induktion von Akute Phase-Reaktionen bei systemischer Inflammation spielt [43, 127]. Auf der einen Seite ergaben Untersuchungen an IL-6 Knock out-Mäusen wesentlich höhere Spiegel an pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-1, was für eine antiinflammatorische Funktion von IL-6 spricht [186]. Außerdem inhibiert IL-6 pro-inflammatorische Zytokine und induziert wahrscheinlich die Ausschüttung antiinflammatorischer Moleküle und extrahepatischer Protease-Inhibitoren [89, 120, 156]. Es ist möglich, dass in der hier vorliegenden Untersuchung das erhöhte IL-6, als immunregulatorische Aufgabe, die Supprimierung von TNF- α verursacht. Auf der anderen Seite induziert IL-6 das Einwandern von Entzündungszellen, inhibiert deren Apoptose und die regulatorische T-Zell-Differenzierung [5, 123, 124, 132]. Die unterschiedlichen Auswirkungen von IL-6 auf inflammatorische Prozesse im Körper beruhen dabei auf unterschiedlichen Signalwegen [90, 123, 132, 137]. Weitergehende molekularbiologische Untersuchungen sind nötig, um diese Signalwege in einen Zusammenhang mit der von uns gemessenen Exhalation des Markers in der Ausatemluft zu verknüpfen.

In unseren Untersuchungen war die Konzentration von IL-10 vor allem in der Hochdosis-Gruppe zu Beginn im Vergleich zur Kontrollgruppe sehr niedrig. Zum Zeitpunkt der 12 h-Messung konnte wiederum ein erhöhter Spiegel an IL-10 in beiden Inflammationsgruppen nachgewiesen werden. Normalerweise wird ein hoher Spiegel an TNF- α durch frühzeitige und nachhaltige Expression von antiinflammatorischem IL-

10 ausgeglichen [56]. IL-10 unterdrückt u.a. die Produktion von Entzündungsmediatoren, einschließlich TNF- α , hemmt die Rekrutierung von Leukozyten an den Ort der Entzündung und hält den Gewebeschaden in Grenzen [37, 42, 47, 48, 177]. Demnach wird IL-10 eine protektive Rolle im Zuge der systemischen Inflammation zugeschrieben [49, 53]. Jedoch wurde ein initiales Fehlen von IL-10 bereits bei intrazellulären Infektionen als Vorteil beschrieben, da so der initial pro-inflammatorische Mechanismus zu einem Absterben des Pathogens führen kann [100, 130]. Anschließend sorgt die Hochregulierung von IL-10 dafür, dass es nicht zu einer überschießenden Wirtsantwort kommt. Niedrige Konzentrationen von IL-10 über einen längeren Zeitraum wurden wiederum als schädlich demonstriert, da so erhöhte Mengen an pro-inflammatorischen Mediatoren produziert und freigesetzt werden und zu systemischen Krankheitsverläufen wie septischem Schock führen können [69, 100, 130]. Auch in unseren Untersuchungen zeichnete sich in beiden Inflammationsgruppen dieses Muster des niedrigen IL-10-Spiegels zu Beginn ab, welches im Laufe der Untersuchung anstieg. Vor allem die Hochdosis-Gruppe wies einen erheblichen Konzentrationsanstieg während systemischer Inflammation auf. Folglich kann spekuliert werden, dass ähnliche Prozesse mit einem undulierenden Verlauf der IL-10 Plasmakonzentration, wie sie auf Einzelzellebene beschrieben wurden, im Rahmen unseres Tiermodells aktiv waren [100, 130].

TNF- α wurde den Tieren zum Versuchsbeginn exogen zur Induktion der Entzündung verabreicht. Aus diesem Grund konnte TNF- α nicht mehr verlässlich als Zytokin im Serum der Versuchstiere untersucht werden, und wurde deshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt.

7.2.2. HovaCal®-Messung

Mittels der HovaCal®-Messung wurde ermittelt, ob die in den Tiermessungen erhobenen signifikanten Peaks direkt dem TNF- α als injizierte Substanz selbst zuzuschreiben sind. Dazu wurde eine TNF- α -Lösung gemessen. Dabei konnten keine der in der Ausatemluft gemessenen VOCs mit dem Testgasgenerator HovaCal® detektiert werden.

Auf der einen Seite könnte das Fehlen dieser VOCs darauf beruhen, dass diese während der Verdampfung der TNF- α -Lösung bei 100 °C Dimere bilden. Dieser

Vorgang ist nötig, damit das HovaCal® die Substanz adäquat analysieren kann. Allerdings finden sich diese Dimere nicht in der Ausatemluft [76]. Folglich könnte die Bildung von Dimeren das entstehende Signalspektrum im HovaCal verschieben und das Ergebnis verzerren.

Auf der anderen Seite könnte das Messergebnis allerdings auch bestätigen, dass die detektierten VOCs in der Atemluft bei Ratten kein direktes Produkt von TNF- α sind, sondern tatsächlich erst aufgrund von inflammatorischen Prozessen im Organismus entstehen. Um diese Hypothese zu erklären, erfolgte eine ausführliche Literaturrecherche zur Rolle der einzelnen signifikanten VOCs während des Inflammationsprozesses. Da die vier VOCs teils von uns zum ersten Mal in einem Zusammenhang mit der Inflammation beschrieben wurden, sind zur endgültigen Klärung der Funktion der VOCs weitere molekularbiologische Studien nötig. 1-Butanol war eines der signifikanten Signale in den Inflammationsgruppen, für welches eine antiinflammatorische Funktion beschrieben wurde [18].

7.2.3. Patientenmessung

Die Ergebnisse der Patientenmessung weisen auf Parallelen mit den signifikanten vier VOCs der Tiermessungen hin. Für den Vergleich mit den Tiermessungen ist es sinnvoll, die Werte der VOCs ab dem Zeitpunkt nach Studienmedikationsgabe, also 3,5 h nach Beginn der Messungen, zu betrachten. 1-Butanol und 1-Pentanol stiegen zu Beginn noch leicht an und blieben dann auf einem stabilen Niveau. 2,5 h nach TNF- α -Gabe zeigten die Intensitäten der beiden VOCs eine abfallende Tendenz. Auch bei den Inflammationsgruppen der Sprague-Dawley®-Ratten waren die Signalintensitäten von 1-Butanol und 1-Pentanol zu Beginn konstant und fielen etwa 2-3 h nach TNF- α -Gabe ab. Auch die Intensitäten von 3-Pentanon während der Patientenmessung weisen Ähnlichkeiten zur Inflammation im Tiermodell auf. Zum einen wurden in beiden Untersuchungen im Vergleich zu den drei anderen untersuchten VOCs viel höhere Signalintensitäten gemessen. Zum anderen blieben sowohl während den ersten beiden Stunden der Patientenmessung nach Studienmedikationsgabe als auch im gleichen Zeitraum bei den Tiermessungen die Intensitäten von 3-Pentanon konstant hoch. Erst danach fielen die Werte in beiden Tiergruppen mit Inflammation drastisch ab. Auch gegen Ende der Patientenmessung konnte eine abfallende Tendenz

ausgemacht werden. Die p-Cymol-Werte der Patientin nach Studienmedikationsgabe glichen am ehesten der p-Cymol-Kurve der Niedrigdosis-Gruppe. In beiden Fällen blieben die Intensitäten von p-Cymol über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant. Allerdings fehlen zur validen Aussage über Signifikanzen noch mehrere Messungen an verschiedenen Patienten sowie eine Kontrollgruppe. Zum einen erschweren eine viel größere Anzahl an nicht zu standardisierenden Umständen die Untersuchung der humanen Ausatemluft bei Patienten. Zum anderen wird TNF- α sehr selten therapeutisch verabreicht. Die ILP ist eines der Verfahren, welches in Deutschland aufgrund der teils gravierenden Nebenwirkungen kaum durchgeführt wird [39, 101]. Zusätzlich sind die Zeitachsen der Untersuchung am Menschen und am Tier sehr verschieden. Im Tiermodell zeigte sich, dass die meisten VOCs etwa 2-3 h nach Gabe der Studienmedikationsgabe auf die systemische Inflammation reagierten. Die Patientenmessung ermöglichte aber nur eine Messung von insgesamt 6 h, von denen nur 2,5 h den Zeitraum in systemischer Inflammation widerspiegeln. Nichtsdestotrotz ist es uns gelungen, in diesem Pilot-Versuchsaufbau die im Tiermodell untersuchten VOCs zu detektieren und ihren Verlauf während einer systemischen Entzündung aufzuzeigen. Eine Erweiterung der Patientenzahl könnte damit einen ersten Schritt für die Einführung der Atemluftanalyse in die klinische Praxis darstellen.

7.2.4. Limitationen der Studie

Die vorliegende Studie weist einige Limitationen auf, die bei möglichen Schlussfolgerungen zu berücksichtigen sind. Von den 73 gemessenen VOCs des physiologischen Atemluftprofils der Ratte konnten 24 VOCs bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht identifiziert werden. Demnach limitiert dies die Aussage über die Anzahl der VOCs, die während systemischer Inflammation signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ansteigen. Die Bedeutung der biomedizinischen Rolle ebendieser unbekannten VOCs ist daher nur sehr eingeschränkt nachvollziehbar. Außerdem blieben die Beatmungseinstellungen der Ratte, wie z.B. das Tidalvolumen und die Atemfrequenz, nicht über den gesamten Versuchszeitraum konstant. Gerade diese Schwankungen, die bereits bei nicht kontrolliert beatmeten Mäusen kritisiert wurden (siehe Kapitel 7.1.1), sind zu einem gewissen Teil auch in unserem Tiermodell zu beanstanden [106, 164]. Es ist durchaus möglich, dass auch in der vorliegenden

Untersuchung Messungenauigkeiten der volatilen Biomarker durch Atmen im Bereich des Totraumvolumens entstanden sind. Allerdings spiegelt das Verändern der Beatmungseinstellungen je nach den Werten der BGA den klinischen Standard auf Intensivstationen besser wider [105]. Zuletzt bieten Tiermodelle einen weitaus höheren Grad der Standardisierung, als es in der menschlichen Forschung möglich ist. Die nicht zu standardisierenden Umstände in der menschlichen Atemluftanalyse entstehen durch die unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten, das Rauchen und die Einnahme von Medikamenten bei verschiedenen Grunderkrankungen potentieller Patienten [112, 113]. Aus diesem Grund gilt es in der Bewertung von Ergebnissen aus tierexperimentellen Untersuchungen zu berücksichtigen, dass Menschen und andere Säugetiere in ihrem physiologischen und pathologischen Zustand variieren. Deswegen ist eine direkte Übertragung nur limitiert möglich.

7.3. Schlussfolgerung und klinische Perspektiven

Die MCC-IMS-Atemluftanalyse stellt einen potenziell praktikablen Weg dar, um die Atemluftanalyse klinisch nutzbar zu machen. In der vorliegenden Arbeit konnten vier VOCs nachgewiesen werden, die im tierexperimentellen Versuchsaufbau reproduzierbar zu detektieren waren. Diese konnten darüber hinaus ebenfalls in einem ersten humanen Pilotprojekt gemessen werden. Folglich könnte die Analyse dieser Komponenten in der Ausatemluft der Diagnostik von systemischen Entzündungsreaktionen dienen.

Um diese Technik verlässlich anzuwenden, sind zusätzliche molekularbiologische Untersuchungen nötig. Da die Herkunft der von uns gemessenen Signale teils noch ungeklärt ist, können noch keine Aussagen über deren Rolle als wichtige Marker während eines Entzündungsprozesses getroffen werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen könnten demnach erste klinische Studien initiiert werden. Dabei bietet die Analyse der Atemluft den Vorteil, dass kein invasiver Eingriff nötig wird. Entsprechend könnten humane Versuchsgruppen in großer Zahl vergleichsweise leicht akquiriert werden. Dabei könnte evaluiert werden, ob die von uns gemessenen Marker 1-Butanol, 1-Pentanol, 3-Pentanon und p-Cymol sensitive oder spezifische Marker darstellen, um den Verlauf einer humanen systemischen Entzündungsreaktion nachzuvollziehen.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit mithilfe einer tierexperimentellen Grundsatzstudie der Nachweis erbracht werden, dass einige volatile Biomarker zuverlässig während einer systemischen Entzündungsreaktion detektiert werden können. Basierend auf diesem standardisierten Tiermodell werden nun weitere Testreihen notwendig sein, um die Translation in den klinischen Alltag erfolgreich zu vollziehen.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aguilera-Herrador E, Cardenas S, Ruzsanyi V, Sielemann S, Valcarcel M (2008) Evaluation of a new miniaturized ion mobility spectrometer and its coupling to fast gas chromatography multicapillary columns. *Journal of Chromatography A* 1214: 143-150
2. Albrecht FW, Hüppe T, Fink T, Maurer F, Wolf A, Wolf B, Volk T, Baumbach JI, Kreuer S (2015) Influence of the respirator on volatile organic compounds: an animal study in rats over 24 hours. *Journal of Breath Research* 9: 016007
3. Allardyce RA, Langford VS, Hill AL, Murdoch DR (2006) Detection of volatile metabolites produced by bacterial growth in blood culture media by selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). *Journal of Microbiological Methods* 65: 361-365
4. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Critical Care Medicine* 20: 864–874
5. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C (2000) Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nature Medicine* 6: 583-588
6. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S (2009) Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of Clinical Oncology* 27: 6199-6206
7. Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *The Lancet* 357: 539–545
8. Baumbach J, Maddula S, Sommerwerck U, Besa V, Kurth I, Bödeker B, Teschler H, Freitag L, Darwiche K (2011) Significant different volatile biomarker during bronchoscopic ion mobility spectrometry investigation of patients suffering lung carcinoma. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry* 14: 159-166

9. Baumbach JI (2009) Ion mobility spectrometry coupled with multi-capillary columns for metabolic profiling of human breath. *Journal of Breath Research* 3: 034001
10. Bell RC (1983) Multiple organ system failure and infection in adult respiratory distress syndrome. *Annals of Internal Medicine* 99: 293
11. Berchtold C, Bosilkovska M, Daali Y, Walder B, Zenobi R (2014) Real-time monitoring of exhaled drugs by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 33: 394-413
12. Bessa V, Darwiche K, Teschler H, Sommerwerck U, Rabis T, Baumbach JI, Freitag L (2011) Detection of volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) by ion mobility spectrometry. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry* 14: 7-13
13. Biesmans S, Bouwknecht JA, Ver Donck L, Langlois X, Acton PD, De Haes P, Davoodi N, Meert TF, Hellings N, Nuydens R (2015) Peripheral administration of tumor necrosis factor-alpha induces neuroinflammation and sickness but not depressive-like behavior in mice. *Biomed Research International* 2015: 716920
14. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101: 1644–1655
15. Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V (2006) Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA* 295: 2275-2285
16. Brosnan JT, Brosnan ME (2006) Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *The Journal of Nutrition* 136: 207S-211S
17. Buchinger H, Kreuer S, Hellbrück R, Wolf A, Fink T, Volk T, Bödeker B, Maddula S, Baumbach JI (2013) Minimal retarded propofol signals in human breath using ion mobility spectrometry. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry* 16: 185–190

18. Cai C, Chen Y, Zhong S, Ji B, Wang J, Bai X, Shi G (2014) Anti-inflammatory activity of n-butanol extract from *ipomoea stolonifera* In vivo and in vitro. PLOS ONE 9: e95931
19. Cakir Y, Métrailler L, Baumbach JI, Kraus T (2013) Signals of asbestos in human breath - preliminary results. Breath'13: Int. Conf. on Breath Research, p. 9
20. Catorce MN, Gevorkian G (2016) LPS-induced murine neuroinflammation model: main features and suitability for pre-clinical assessment of nutraceuticals. Current Neuropharmacology 14: 155-164
21. Celsus AC (8.VII.1493) Avrelii Cornelii Celsi Medicinae Liber Primvs Incipit.
22. Cerami A, Tracey KJ, Lowry SF, Beutler B (1987) Cachectin: a pluripotent hormone released during the host response to invasion. Recent Progress in Hormone Research 43: 99-112
23. Chauhan M, Harnois J, Kovar J, Pilon P (1991) Trace analysis of cocaine and heroin in different customs scenarios using a custom-built ion mobility spectrometer. Canadian Society of Forensic Science Journal 24: 43–49
24. Chettibi SF (1988) Inflammation: basic principles and clinical correlates. Annals of the Rheumatic Diseases 47: 792
25. Cohen MJ, Karasek F (1970) Plasma chromatography™—a new dimension for gas chromatography and mass spectrometry. Journal of Chromatographic Science 8: 330-337
26. Cohen MJ, Karasek FW (1970) Plasma chromatography -a new dimension for gas chromatography and mass spectrometry. Journal of Chromatographic Science 8: 330–337
27. Cohnheim J (1867) Ueber entzündung und eiterung. Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin 40: 1-79
28. Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. Nature 420: 860–867
29. Cumeras R, Figueras E, Davis CE, Baumbach JI, Gracia I (2015) Review on ion mobility spectrometry. Part 1: current instrumentation. The Analyst 140: 1376–1390
30. Cumeras R, Figueras E, Davis CE, Baumbach JI, Gracia I (2015) Review on ion mobility spectrometry. Part 2: hyphenated methods and effects of experimental parameters. The Analyst 140: 1391–1410

31. Dale HH, Laidlaw PP (1910) The physiological action of β -iminazolyethylamine. The Journal of Physiology 41: 318
32. Dale HH, Laidlaw PP (1911) Further observations on the action of β -iminazolyethylamine. The Journal of Physiology 43: 182
33. Damuni Z, Reed LJ (1987) Purification and properties of the catalytic subunit of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase phosphatase from bovine kidney mitochondria. Journal of Biological Chemistry 262: 5129-5132
34. Darwiche K, Baumbach JI, Sommerwerck U, Teschler H, Freitag L (2011) Bronchoscopically obtained volatile biomarkers in lung cancer. Lung 189: 445-452
35. Deroose JP, Grünhagen DJ, van Geel AN, de Wilt JHW, Eggermont AMM, Verhoef C (2011) Long-term outcome of isolated limb perfusion with tumour necrosis factor- α for patients with melanoma in-transit metastases. British Journal of Surgery 98: 1573-1580
36. Devenport NA, Reynolds JC, Parkash V, Cook J, Weston DJ, Creaser CS (2011) Determination of free desmosine and isodesmosine as urinary biomarkers of lung disorder using ultra performance liquid chromatography - ion mobility-mass spectrometry. Journal of Chromatography B 879: 3797-3801
37. Echtenacher B, Falk W, Männel D, Krammer P (1990) Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. The Journal of Immunology 145: 3762-3766
38. Eiceman GA, Snyder AP, Blyth DA (1990) Monitoring of airborne organic vapors using ion mobility spectrometry. International Journal of Environmental Analytical Chemistry 38: 415-425
39. Eigentler TK, Mühlenbein C, Follmann M, Schadendorf D, Garbe C (2017) S3 - Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms-Update 2015/2016, Kurzversion 2.0. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 15:
40. Eiseman B, Beart R, Norton L (1977) Multiple organ failure. Surgery, Gynecology & Obstetrics 144: 323-326

41. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K (2007) Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Medicine* 33: 606–618
42. Eskandari M, Bolgos G, Miller C, Nguyen D, DeForge L, Remick D (1992) Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. *The Journal of Immunology* 148: 2724-2730
43. Fattori E, Cappelletti M, Costa P, Sellitto C, Cantoni L, Carelli M, Faggioni R, Fantuzzi G, Ghezzi P, Poli V (1994) Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine* 180: 1243-1250
44. Fink T, Albrecht FW, Maurer F, Kleber A, Hüppe T, Schnauber K, Wolf B, Baumbach JI, Volk T, Kreuer S (2015) Exhalation pattern changes during fasting and low dose glucose treatment in rats. *Analytical and Bioanalytical chemistry* 407: 3763–3773
45. Fink T, Baumbach JI, Kreuer S (2014) Ion mobility spectrometry in breath research. *Journal of Breath Research* 8: 027104
46. Fink T, Wolf A, Maurer F, Albrecht FW, Heim N, Wolf B, Hauschild AC, Bödeker B, Baumbach JI, Volk T (2015) Volatile organic compounds during inflammation and sepsis in rats. A potential breath test using ion-mobility spectrometry. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 122: 117-126
47. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL (1992) Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 257: 387-389
48. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann T, Howard M, O'Garra A (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *The Journal of Immunology* 147: 3815-3822
49. Florquin S, Amraoui Z, Abramowicz D, Goldman M (1994) Systemic release and protective role of IL-10 in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. *The Journal of Immunology* 153: 2618-2623

50. Fraker DL, Alexander HR, Andrich M, Rosenberg SA (1996) Treatment of patients with melanoma of the extremity using hyperthermic isolated limb perfusion with melphalan, tumor necrosis factor, and interferon gamma: results of a tumor necrosis factor dose-escalation study. *Journal of Clinical Oncology* 14: 479-489
51. Fry DE, Pearlstein L, Fulton RL, Polk HC (1980) Multiple system organ failure: the role of uncontrolled infection. *Archives of Surgery* 115: 136–140
52. Furtwängler R, Hauschild AC, Hübel J, Rakicioglou H, Bödeker B, Maddula S, Simon A, Baumbach JI (2014) Signals of neutropenia in human breath? *International Journal for Ion Mobility Spectrometry* 1: 19-23
53. Gerard C, Bruyins C, Marchant A, Abramowicz D, Vandenabeele P, Delvaux A, Fiers W, Goldman M, Velu T (1993) Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *Journal of Experimental Medicine* 177: 547-550
54. Gordon S, Szidon J, Krotoszynski B, Gibbons R, O'Neill H (1985) Volatile organic compounds in exhaled air from patients with lung cancer. *Clinical Chemistry* 31: 1278-1282
55. Grossherr M, Hengstenberg A, Meier T, Dibbelt L, Gerlach K, Gehring H (2006) Discontinuous monitoring of propofol concentrations in expired alveolar gas and in arterial and venous plasma during artificial ventilation. *Anesthesiology* 104: 786–790
56. Grünig G, Corry DB, Leach MW, Seymour BW, Kurup VP, Rennick DM (1997) Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Journal of Experimental Medicine* 185: 1089-1100
57. Guamán AV, Carreras A, Calvo D, Agudo I, Navajas D, Pardo A, Marco S, Farré R (2012) Rapid detection of sepsis in rats through volatile organic compounds in breath. *Journal of chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 881-882: 76–82
58. Hadan H IN, Yonemura Y, Maddula S (2013) Volatile metabolites arising from lung cancer in Japan. *Breath'13: Int. Conf. on Breath Research 2013*: p. 30
59. Handa H, Usuba A, Maddula S, Baumbach JI, Mineshita M, Miyazawa T (2014) Exhaled breath analysis for lung cancer detection using ion mobility spectrometry. *PLOS ONE* 9: e114555

60. Handwerker H (1998) Pathophysiologie des Juckreizes. *Dermatologie* 43-45
61. Harris RA, Kobayashi R, Murakami T, Shimomura Y (2001) Regulation of branched-chain α -keto acid dehydrogenase kinase expression in rat liver. *The Journal of Nutrition* 131: 841S-845S
62. Harris RA, Zhang B, Goodwin GW, Kuntz MJ, Shimomura Y, Rougraff P, Dexter P, Zhao Y, Gibson R, Crabb DW (1990) Regulation of the branched-chain α -ketoacid dehydrogenase and elucidation of a molecular basis for maple syrup urine disease. *Advances in Enzyme Regulation* 30: 245-256
63. Henderson B, Pettipher ER (1989) Arthritogenic actions of recombinant IL-1 and tumour necrosis factor alpha in the rabbit: evidence for synergistic interactions between cytokines in vivo. *Clin Exp Immunol* 75: 306-310
64. Hietaranta A, Kemppainen E, Puolakkainen P, Sainio V, Haapiainen R, Peuravuori H, Kivilaakso E, Nevalainen T (1999) Extracellular phospholipases A2 in relation to systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and systemic complications in severe acute pancreatitis. *Pancreas* 18: 385-391
65. Homey B, Müller A, Zlotnik A (2002) Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nature reviews. Immunology* 2: 175–184
66. Hoover-Plow JL, Gong Y, Shchurin A, Busuttill SJ, Schneeman TA, Hart E (2008) Strain and model dependent differences in inflammatory cell recruitment in mice. *Inflammation Research* 57: 457-463
67. Hornuss C, Praun S, Villinger J, Dornauer A, Moehnle P, Dolch M, Weninger E, Chouker A, Feil C, Briegel J, Thiel M, Schelling G (2007) Real-time monitoring of propofol in expired air in humans undergoing total intravenous anesthesia. *Anesthesiology* 106: 665–674
68. Hüppe T, Klasen R, Maurer F, Meiser A, Groesdonk HV, Sessler DI, Fink T, Kreuer S (2019) Volatile organic compounds in patients with acute kidney injury and changes during dialysis. *Critical Care Medicine* 47: 239-246
69. Iyer SS, Cheng G (2012) Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Critical Reviews in Immunology* 32: 23-63
70. Janfelt C, Frandsen H, Lauritsen FR (2006) Characterization of a mini membrane inlet mass spectrometer for on-site detection of contaminants in both aqueous and liquid organic samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20: 1441-1446

71. Jansson B, Larsson B (1969) Analysis of organic compounds in human breath by gas chromatography-mass spectrometry. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 74: 961-966
72. Jünger M, Bödeker B, Baumbach JI (2010) Peak assignment in multi-capillary column-ion mobility spectrometry using comparative studies with gas chromatography-mass spectrometry for VOC analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396: 471-482
73. Kanu AB, Hill HH (2008) Ion mobility spectrometry detection for gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1177: 12-27
74. Karasek FW, Clement RE (2012) Basic gas chromatography-mass spectrometry: principles and techniques. Elsevier Verlag
75. Karasek FW, Denney DW (1974) Detection of 2,4,6-trinitrotoluene vapours in air by plasma chromatography. *Journal of Chromatography A* 93: 141-147
76. Kleber A, Maurer F, Lorenz D, Wolf B, Albrecht F, Shopova T, Sessler DI, Volk T, Kreuer S, Fink T (2016) Metabolism of 3-pentanone under inflammatory conditions. *Journal of Breath Research* 10: 047101
77. Kolla P (1995) Detecting hidden explosives. *Analytical Chemistry* 67: 184A-189A
78. Koops HS, Vaglini M, Suciú S, Kroon B, Thompson JF, Göhl J, Eggermont A, Di Filippo F, Krententz ET, Ruiter D (1998) Prophylactic isolated limb perfusion for localized, high-risk limb melanoma: results of a multicenter randomized Phase III trial. European organization for research and treatment of cancer malignant melanoma cooperative group protocol 18832, the world health organization melanoma program trial 15, and the North American perfusion group southwest oncology group-8593. *Journal of Clinical Oncology* 16: 2906-2912
79. Kreuer S, Hauschild A, Fink T, Baumbach JI, Maddula S, Volk T (2014) Two different approaches for pharmacokinetic modeling of exhaled drug concentrations. *Scientific Reports* 4: 5423
80. Ksontini R, MacKay SD, Moldawer LL (1998) Revisiting the role of tumor necrosis factor α and the response to surgical injury and inflammation. *Archives of Surgery* 133: 558-567

81. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M (2006) Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine* 34: 1589–1596
82. Langevin P (1903) Recombinaison et mobilités des ions dans les gaz. *Ann. Chim. Phys* 28: 122
83. Lehnert W, Junker A (1980) 2-Methyl-3-oxovaleriansäure: ein charakteristischer metabolit bei propionacidämie. *Clinica Chimica Acta* 104: 47-51
84. Lens MB, Dawes M (2003) Isolated limb perfusion with melphalan in the treatment of malignant melanoma of the extremities: a systematic review of randomised controlled trials. *The Lancet Oncology* 4: 359-364
85. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G (2001) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Medicine* 29: 530–538
86. Lewis T, Zotterman Y (1927) Vascular reactions of the skin to injury. *The Journal of Physiology* 62: 280-288
87. Libardoni M, Stevens P, Waite JH, Sacks R (2006) Analysis of human breath samples with a multi-bed sorption trap and comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCx GC). *Journal of Chromatography B* 842: 13-21
88. Loria V, Dato I, Graziani F, Biasucci LM (2008) Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediators of Inflammation* 2008: 135625
89. Lotz M, Guerne P (1991) Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *Journal of Biological Chemistry* 266: 2017-2020
90. Luig M, Kluger MA, Goerke B, Meyer M, Nosko A, Yan I, Scheller J, Mittrücker HW, Rose-John S, Stahl RA (2015) Inflammation-induced IL-6 functions as a natural brake on macrophages and limits GN. *Journal of the American Society of Nephrology* 26: 1597-1607

91. Maddula S, Rabis T, Sommerwerck U, Anhenn O, Darwiche K, Freitag L, Teschler H, Baumbach Jrl (2011) Correlation analysis on data sets to detect infectious agents in the airways by ion mobility spectrometry of exhaled breath. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry* 14: 197–206
92. Marzoug HNB, Romdhane M, Lebrihi A, Mathieu F, Couderc F, Abderraba M, Khouja ML, Bouajila J (2011) Eucalyptus oleosa essential oils: chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the oils from different plant parts (stems, leaves, flowers and fruits). *Molecules* 16: 1695
93. Matsumoto I, Shinka T, Kuhara T, Oura T, Yamamoto H, Hase Y, Aoki H, Isshiki G, Tada K (1978) Investigation of unusual metabolites in the urine of a patient with propionic acidemia. *Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine* 203-216
94. Mattick JS, Kamisoglu K, Ierapetritou MG, Androulakis IP, Berthiaume F (2013) Branched-chain amino acid supplementation: impact on signaling and relevance to critical illness. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 5: 449-460
95. Maurer F, Walter L, Geiger M, Baumbach JI, Sessler DI, Volk T, Kreuer S (2017) Calibration and validation of a MCC/IMS prototype for exhaled propofol online measurement. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 145: 293-297
96. Medzhitov R (2010) Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 140: 771–776
97. Menkes JH (1966) Idiopathic hyperglycinemia: isolation and identification of three previously undescribed urinary ketones. *The Journal of Pediatrics* 69: 413-421
98. Metchnikoff E (1892) Zur Immunitätlehre. 11te Deutschen Kongress für innere Medezin: 282-289
99. Moncada S, Ferreira SH, Vane JR (1973) Prostaglandins, aspirin-like drugs and the oedema of inflammation. *Nature* 246: 217-219
100. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology* 19: 683-765
101. Moreno-Ramirez D, La Cruz-Merino LD, Ferrandiz L, Villegas-Portero R, Nieto-Garcia A (2010) Isolated limb perfusion for malignant melanoma: systematic review on effectiveness and safety. *The Oncologist* 15: 416–427

102. Müller-Ladner U, Alten R, Heiligenhaus A, Kekow J, Koletzko S, Mrowietz U, Ochsenkühn T, Radke M, Reich K, Rudwaleit M, Schreiber S (2009) „TRECID”: TNF α -assoziierte chronisch entzündliche Erkrankungen. Deutsche medizinische Wochenschrift 134: 2132-2136
103. Müller-Werdan U, Prondzinsky R, Witthaut R, Stache N, Heinroth K, Kuhn C, Schmidt H, Busch I, Werdan K (1996) The heart in infection and MODS (multiple organ dysfunction syndrome). Wiener klinische Wochenschrift 109: 3-24
104. Neri G, Lacquaniti A, Rizzo G, Donato N, Latino M, Buemi M (2012) Real-time monitoring of breath ammonia during haemodialysis: use of ion mobility spectrometry (IMS) and cavity ring-down spectroscopy (CRDS) techniques. Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association 27: 2945–2952
105. Neto AS, Cardoso SO, Manetta JA, Pereira VGM, Espósito DC, Pasqualucci MDOP, Damasceno MCT, Schultz MJ (2012) Association between use of lung-protective ventilation with lower tidal volumes and clinical outcomes among patients without acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis. JAMA 308: 1651-1659
106. Neuhaus S, Seifert L, Vautz W, Nolte J, Bufe A, Peters M (2011) Comparison of metabolites in exhaled breath and bronchoalveolar lavage fluid samples in a mouse model of asthma. Journal of Applied Physiology 111: 1088-1095
107. Pagonas N, Vautz W, Seifert L, Slodzinski R, Jankowski J, Zidek W, Westhoff TH (2012) Volatile organic compounds in uremia. PLOS ONE 7: e46258
108. Pereira R, Faria R, Lago P, Torres T (2017) Infection and malignancy risk in patients treated with TNF inhibitors for immune-mediated inflammatory diseases. Current Drug Safety 12: 162-170
109. Perl T, Carstens E, Hirn A, Quintel M, Vautz W, Nolte J, Jünger M (2009) Determination of serum propofol concentrations by breath analysis using ion mobility spectrometry. British Journal of Anaesthesia 103: 822–827
110. Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, Glaccum MB, Otten C, Willis CR, Charrier K, Morrissey PJ, Ware CB, Mohler KM (1998) TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. The Journal of Immunology 160: 943-952

111. Pflugfelder A, Kochs C, Blum A, Capellaro M, Czeschik C, Dettenborn T, Dill D, Dippel E, Eigentler T, Feyer P (2013) Malignes Melanom S3 - Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanom. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 11: 1-126
112. Phillips M, Cataneo RN, Chaturvedi A, Kaplan PD, Libardoni M, Mundada M, Patel U, Zhang X (2013) Detection of an extended human volatome with comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. PLOS ONE 8: e75274
113. Phillips M, Herrera J, Krishnan S, Zain M, Greenberg J, Cataneo RN (1999) Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 729: 75-88
114. Pleil JD, Hubbard HF, Sobus JR, Sawyer K, Madden MC (2008) Volatile polar metabolites in exhaled breath condensate (EBC): collection and analysis. Journal of Breath Research 2: 026001
115. Preston JM, Karasek FW, Kim SH (1977) Plasma chromatography of phosphorus esters. Analytical Chemistry 49: 1746–1750
116. Rabis T, Sommerwerck U, Anhenn O, Darwiche K, Freitag L, Teschler H, Bödeker B, Maddula S, Baumbach JI (2011) Detection of infectious agents in the airways by ion mobility spectrometry of exhaled breath. International Journal for Ion Mobility Spectrometry 14: 187–195
117. Rao TS, Currie JL, Shaffer AF, Isakson PC (1994) In vivo characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 269: 917-925
118. Raschick F, Monsé C, Gusbeth K, Maybaum B, Giesen Y, Breuer D, Monz C (2016) Ringversuche für innerbetriebliche und außerbetriebliche Messstellen an der Prüfgasstrecke des Instituts für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA). Gefahrstoffe-Reinhalt. Luft 76: 78-84
119. Reis ML, Okino L, Rocha e Silva M (1973) Bradykinin derivatives as permeability factors. Agents Actions 3: 383
120. Richards CD, Shoyab M, Brown TJ, Gauldie J (1993) Selective regulation of metalloproteinase inhibitor (TIMP-1) by oncostatin M in fibroblasts in culture. The Journal of Immunology 150: 5596-5603
121. Rocha e Silva M (1978) A brief survey of the history of inflammation. Inflammation Research 8: 45-49

122. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H (2009) The sterile inflammatory response. *Annual Review of Immunology* 28: 321-342
123. Rose-John S (2012) IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International Journal of Biological Sciences* 8: 1237
124. Rose-John S, Mitsuyama K, Matsumoto S, Thaiss WM, Scheller J (2009) Interleukin-6 trans-signaling and colonic cancer associated with inflammatory bowel disease. *Current Pharmaceutical Design* 15: 2095-2103
125. Rossi D, Zlotnik A (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annual Review of Immunology* 18: 217–242
126. Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet M, Hauschildt S (2011) LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Critical Reviews in Immunology* 31: 379-446
127. Ruzek MC, Miller AH, Opal SM, Pearce BD, Biron CA (1997) Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6–dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. *Journal of Experimental Medicine* 185: 1185-1192
128. Ruzsányi V (2005) Analyse flüchtiger Metaboliten von der Ausatemluft mittels Ionenmobilitätsspektrometer. Dissertation, TU Dortmund
129. Ruzsanyi V, Sielemann S, Baumbach J (2002) Determination of VOCs in human breath using IMS. *Int. J. Ion Mobility Spectrom* 5: 45-48
130. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J (2010) Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 21: 331-344
131. Sanguedolce MV, Capo C, Bongrand P, Mege JL (1992) Zymosan-stimulated tumor necrosis factor- α production by human monocytes. Down-modulation by phorbol ester. *J Immunol* 148: 2229-2236
132. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S (2011) The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1813: 878-888
133. Scott A, Khan KM, Cook JL, Duronio V (2004) What is “inflammation”? Are we ready to move beyond Celsus? *British Journal of Sports Medicine* 38: 248–249
134. Sedger LM, McDermott MF (2014) TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev* 25: 453-472

135. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, Rubenfeld G, Kahn JM, Shankar-Hari M, Singer M (2016) Assessment of clinical criteria for sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315: 762-774
136. Sharpe RJ, Margolis RJ, Askari M, Amento EP, Granstein RD (1988) Induction of dermal and subcutaneous inflammation by recombinant cachectin/tumor necrosis factor (TNF alpha) in the mouse. *Journal of Investigative Dermatology* 91: 353-357
137. Shaw S, Bourne T, Meier C, Carrington B, Gelinas R, Henry A, Popplewell A, Adams R, Baker T, Rapecki S, Marshall D, Moore A, Neale H, Lawson A (2014) Discovery and characterization of olokizumab. *mAbs* 6: 773-781
138. Sielemann S (2000) Detektion flüchtiger organischer Verbindungen mittels Ionenmobilitätsspektrometrie und deren Kopplung mit Multi-Kapillar-Gas-Chromatographie. Dissertation, TU Dortmund
139. Simpson AE, Tomkins PT, Cooper KL (1997) An investigation of the temporal induction of cytokine mRNAs in LPS-challenged thioglycollate-elicited murine peritoneal macrophages using the reverse transcription polymerase chain reaction. *Inflammation Research* 46: 65-71
140. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM (2016) The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA* 315: 801-810
141. Skillman JJ, Bushnell LS, Goldman H, Silen W (1969) Respiratory failure, hypotension, sepsis, and jaundice. *The American Journal of Surgery* 117: 523–530
142. Smith D, Spanel P (1996) The novel selected-ion flow tube approach to trace gas analysis of air and breath. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 10: 1183-1198
143. Smith LL (1991) Acute inflammation: the underlying mechanism in delayed onset muscle soreness? *Medicine and Science in Sports and Exercise* 23: 542–551
144. Sohn H, Steinhanses J (1998) Use of ion mobility spectrometry for the preliminary evaluation of hazardous military waste sites-opportunities and limitations. *IJIMS* 1: 1-14

145. Stoiser B, Knapp S, Thalhammer F, Locker GJ, Kofler J, Hollenstein U, Staudinger T, Wilfing A, Frass M, Burgmann H (1998) Time course of immunological markers in patients with the systemic inflammatory response syndrome: evaluation of sCD14, sVCAM-1, sELAM-1, MIP-1 α and TGF- β 2. *European Journal of Clinical Investigation* 28: 672–678
146. Strachan NJC, Nicholson FJ, Ogden ID (1995) An automated sampling system using ion mobility spectrometry for the rapid detection of bacteria. *Analytica Chimica Acta* 313: 63–67
147. Sweeney SE, Firestein GS (2004) Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 372–378
148. Szabó AH, Podolec P, Ferenczy V, Kubinec R, Blaško J, Soják L, Górová R, Addova G, Ostrovský I, Višňovský J (2015) The analysis of linear and monomethylalkanes in exhaled breath samples by GC \times GC-FID and GC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* 978: 62–69
149. Takala A, Jousela I, Olkkola KT, Jansson SE, Leirisalo-Repo M, Takkunen O, Repo H (1999) Systemic inflammatory response syndrome without systemic inflammation in acutely ill patients admitted to hospital in a medical emergency. *Clinical Science* 96: 287–295
150. Takita A, Masui K, Kazama T (2007) On-line monitoring of end-tidal propofol concentration in anesthetized patients. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 106: 659–664
151. Tanabe K, Matsushima-Nishiwaki R, Yamaguchi S, Iida H, Dohi S, Kozawa O (2010) Mechanisms of tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. *Journal of Neuroinflammation* 7: 16
152. Tang BMP, Eslick GD, Craig JC, McLean AS (2007) Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: Systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 7: 210–217
153. Taniguchi T, Koido Y, Aiboshi J, Yamashita T, Suzaki S, Kurokawa A (1999) The ratio of interleukin-6 to interleukin-10 correlates with severity in patients with chest and abdominal trauma. *The American Journal of Emergency Medicine* 17: 548–551
154. Tedgui A (2011) Focus on inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31: 958–959

155. Thompson JF, Gianoutsos MP (1992) Isolated limb perfusion for melanoma: effectiveness and toxicity of cisplatin compared with that of melphalan and other drugs. *World Journal of Surgery* 16: 227-233
156. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW (1994) Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83: 113-118
157. Tilney NL, Bailey GL, Morgan AP (1973) Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms: an unsolved problem in postoperative care. *Annals of Surgery* 178: 117-122
158. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ, Zentella A, Albert JD, Shires GT, Cerami A (1986) Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234: 470-474
159. Truscott RJ, Pullin CJ, Halpern B, Hammond J, Haan E, Danks DM (1979) The identification of 3-keto-2-methylvaleric acid and 3-hydroxy-2-methylvaleric acid in a patient with propionic acidemia. *Biological Mass Spectrometry* 6: 294-300
160. Ueda S, Nishio K, Minamino N, Kubo A, Akai Y, Kangawa K, Matsuo H, Fujimura Y, Yoshioka A, Masui K, Doi N, Murao Y, Miyamoto S (1999) Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with systemic inflammatory response syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 160: 132-136
161. van der Bruggen T, Nijenhuis S, van Raaij E, Verhoef J, van Asbeck BS (1999) Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. *Infection and Immunity* 67: 3824-3829
162. Van Reeth K, Nauwynck H, Pensaert M (1998) Bronchoalveolar interferon- α , tumor necrosis factor- α , interleukin-1, and inflammation during acute influenza in pigs: A possible model for humans? *Journal of Infectious Diseases* 177: 1076-1079
163. Vautz W, Nolte J, Bufe A, Baumbach JI, Peters M (2010) Analyses of mouse breath with ion mobility spectrometry: a feasibility study. *Journal of Applied Physiology* 108: 697-704
164. Vautz W, Nolte J, Bufe A, Baumbach JI, Peters M (2010) Analyses of mouse breath with ion mobility spectrometry: a feasibility study. *Journal of Applied Physiology* 108: 697-704

165. Vautz W, Nolte J, Fobbe R, Baumbach JI (2009) Breath analysis - performance and potential of ion mobility spectrometry. *Journal of Breath Research* 3: 036004
166. Vautz W, Schmäh M (2009) HovaCAL® - a generator for multi-component humid calibration gases. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry* 12: 139–147
167. Vautz W, Zimmermann D, Hartmann M, Baumbach JI, Nolte J, Jung J (2006) Ion mobility spectrometry for food quality and safety. *Food Additives and Contaminants* 23: 1064–1073
168. Vestri A, Pierucci F, Frati A, Monaco L, Meacci E (2017) Sphingosine 1-phosphate receptors: do they have a therapeutic potential in cardiac fibrosis? *Frontiers in Pharmacology* 8: 296
169. Vincent JL, De Mendonça A, Cantraine F, Moreno R, Takala J, Suter PM, Sprung CL, Colardyn F, Blecher S (1998) Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. *Critical Care Medicine* 26: 1793-1800
170. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart C, Suter P, Thijs L (1996) The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Medicine* 22: 707-710
171. Virchow R (1897) Die Rolle der Gefäße und des Parenchyms in der Entzündung. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 149: 381–404
172. Virchow R (1858) Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre: 20 Vorlesungen.
173. Voronov E, Apte RN (2017) Targeting the tumor microenvironment by intervention in Interleukin-1 biology. *Current Pharmaceutical Design* 23: 4893-4905
174. Wacker C, Prkno A, Brunkhorst FM, Schlattmann P (2013) Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 13: 426-435

175. Waller A (1846) LVIII. Microscopic observation on the perforation of the capillaries by the corpuscles of the blood, and on the origin of mucus and pus-globules. The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science 29: 397-405
176. Waller A (1846) XLIV. Microscopic examination of some of the principal tissues of the animal frame, as observed in the tongue of the living Frog, Toad, &c. The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science 29: 271-287
177. Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL (1996) Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. Infection and Immunity 64: 4733-4738
178. Weglicki WB, Phillips TM, Freedman AM, Cassidy MM, Dickens BF (1992) Magnesium-deficiency elevates circulating levels of inflammatory cytokines and endothelin. Molecular and Cellular Biochemistry 110: 169-173
179. Weiner HL, Selkoe DJ (2002) Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases. Nature 420: 879-884
180. Werdan K, Schmidt H, Ebelt H, Zorn-Pauly K, Koidl B, Hoke RS, Heinroth K, Müller-Werdan U (2009) Impaired regulation of cardiac function in sepsis, SIRS, and MODS. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 87: 266–274
181. Westhoff M, Litterst P, Maddula S, Bödeker B, Rahmann S, Davies AN, Baumbach JI (2010) Differentiation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) including lung cancer from healthy control group by breath analysis using ion mobility spectrometry. International Journal for Ion Mobility Spectrometry 13: 131–139
182. Whitcomb DC, Wilson AS (2016) Acute pancreatitis as a model to predict transition of systemic inflammation to organ failure in trauma and critical illness. Technical Report 30
183. Wilson H, Monster A (1999) New technologies in the use of exhaled breath analysis for biological monitoring. Occupational and Environmental Medicine 56: 753-757
184. Wilson HK (1986) Breath analysis: physiological basis and sampling techniques. Scandinavian Journal of Work, Environment & Health 174-192

185. Wolf A, Baumbach JI, Kleber A, Maurer F, Maddula S, Favrod P, Jang M, Fink T, Volk T, Kreuer S (2014) Multi-capillary column-ion mobility spectrometer (MCC-IMS) breath analysis in ventilated rats: a model with the feasibility of long-term measurements. *Journal of Breath Research* 8: 016006
186. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK (1998) IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *Journal of Clinical Investigation* 101: 311
187. Yamaguchi S, Tanabe K, Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Iida H, Kozawa O, Dohi S (2009) Involvement of Rho-kinase in tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 release from C6 glioma cells. *Neurochemistry International* 55: 438-445
188. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM (2002) The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Critical Care Medicine* 30: S294-S301

9. DANKSAGUNG

Auf diesem Wege möchte ich gerne all denjenigen danken, die zur Entstehung meiner Dissertation beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Thomas Volk und Herrn Professor Dr. med. Sascha Kreuer für die Überlassung des spannenden Themas und die Möglichkeit im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie des Universitätsklinikums des Saarlandes unter hervorragender Leitung arbeiten zu dürfen.

Meinen großen Dank möchte ich meinem Doktorvater Privatdozent Dr. med. Tobias Fink aussprechen, der mir durch seine kontinuierliche Unterstützung, präzise Anleitung und konstruktive Kritik eine große Hilfe war und einen wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit trägt. Gerade mit seiner ansteckenden Motivation und Freude an der Forschung konnte er mich immer wieder für meine Arbeit begeistern. Danken möchte ich auch Dr. med. Frederic Albrecht, der mich von Anfang an beim Verfassen der Arbeit hilfsbereit betreut hat.

Weiterhin möchte ich mich gerne bei den Mitdoktoranden und Mitarbeitern des Center of Breath Research des Universitätsklinikums des Saarlandes für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die tatkräftige Zusammenarbeit bedanken.

Besonderer Dank gebührt meiner großen und kleinen Familie, die mich mit ihrer bedingungslosen Liebe und uneingeschränkten Unterstützung bereits viel größere Herausforderungen haben schaffen lassen. Ich schätze mich sehr glücklich mit Euch an meiner Seite.

10. PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE

10.1. Abstracts und Kongressbeiträge aus der vorliegenden Arbeit

Albrecht F, Maurer F, **Schwaiblmair MH**, Hüppe T, Wolf B, Volk T, Kreuer S, Fink T (2019) Analyse der Ausatemluft mittels MCC-IMS zur Detektion volatiler organischer Verbindungen (VOCs) während TNF α induzierter Inflammation. *Vortrag auf dem Deutschen Anästhesiecongress DAC*

Schwaiblmair MH, Maurer F, Lorenz D, Kreuer S, Fink T (2015) Biomarker Detektion in der Ausatemluft. Ein standardisierter tierexperimenteller Ansatz. *Vortrag auf dem 6. Symposium „Metaboliten in Prozessabluft und Ausatemluft“ in Reutlingen*

10.2. Weitere Originalarbeiten, Abstracts und Kongressbeiträge

Karschnia P, Jordan JT, Forst DA, Arrilaga-Romany IC, Batchelor TT, Baehring JM, Clement NF, Gonzalez Castro LN, Herlopian A, Maus MV, **Schwaiblmair MH**, Soumerai JD, Takvorian RW, Hochberg EP, Barnes JA, Abramson JS, Frigault MJ, Dietrich J (2019) Clinical presentation, management, and biomarkers of neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CAR T-cells. *Blood* 133: 2212-2221

Karschnia P, Barbiero FJ, **Schwaiblmair MH**, Piepmeier JM, Huttner AJ, Becker KP, Fulbright RK, Baehring JM (2019) Leptomeningeal dissemination from low-grade neuroepithelial CNS tumors in adults: a 15-year experience. *Neuroonc Pract*, in press

Karschnia P, Jordan JT, Forst DA, Arrilaga-Romany IC, Batchelor TT, Baehring JM, Clement NF, Gonzalez Castro LN, Herlopian A, Maus MV, **Schwaiblmair MH**, Soumerai JD, Takvorian RW, Hochberg EP, Barnes JA, Abramson JS, Frigault MJ, Dietrich J (2019) Clinical presentation, management, and biomarkers of neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CAR T-cells. *Neurology* 92: P2.6-036

Karschnia P, Barbiero FJ, **Schwaiblmair MH**, Piepmeier JM, Huttner AJ, Becker KP, Fulbright RK, Baehring JM (2018) Leptomeningeal dissemination from low-grade